

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

METABÓLITOS COMO FERRAMENTA DE SELEÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex*
paraguariensis A. St. Hill.) PARA FINS INDUSTRIAIS

CURITIBA

2018

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

METABÓLITOS COMO FERRAMENTA DE SELEÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex*
paraguariensis A.St.Hill.) PARA FINS INDUSTRIAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Co-orientador: Dr. Fabrício Augusto Hansel

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M528m

Melo, Tamires Oliveira de

Metabólitos como ferramenta de seleção de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) para fins industriais / Tamires Oliveira de Melo. – Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Francisco de Assis Marques. Coorientador: Fabrício Augusto Hansel

1. Erva-mate. 2. Nutrição. 3. Compostos bioativos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Hansel, Fabrício Augusto. IV. Título.

CDD: 630

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

**METABÓLITOS COMO FERRAMENTA PARA SELEÇÃO DE ERVA-
MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* A. ST. HILL.) PARA FINS
INDUSTRIAIS**

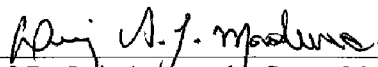
por

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

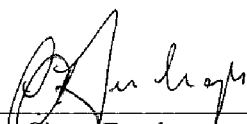
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



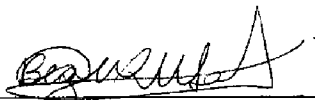
Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Dep. de Química – UFSC



Prof. Dr. Cicero Deschamps
Dep. de Fitotecnia e Fitossanitarismo – UFPR



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 26 de outubro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora de Aparecida que são alfa e ômega em tudo na minha vida.

Aos meus pais Hilda e João Batista, pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Por serem meu referencial de conduta.

À minha irmã Viviane por ser meu farol durante as tempestades, por me guiar e me fazer crer no impossível.

À minha madrinha Leonilda, meu avô Geraldo e meus tios Sueli e Valdecir por sempre apoiarem minhas decisões.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, por ter aceitado o desafio de me orientar, por todo auxílio e parceria.

Ao Dr. Fabrício Augusto Hansel, por sua orientação, apoio e incentivo, por me inspirar a crescer como ser humano e profissional.

Ao pesquisador Dr. Joachim Kopka por toda ajuda e conhecimento compartilhado. *“Danke und bis bald!”*

Ao Alexander Erban e Ines Fehrle pelo auxílio técnico.

À Embrapa Florestas pelo espaço concedido, imprescindível para execução do trabalho.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Química por possibilitar a realização do doutorado.

Ao Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas que possibilitou a concretização do trabalho.

Aos amigos Diana Pimentel e Gustavo Mansur por terem tornado minha adaptação aos dias frios alemães e, a comunicação, menos difíceis.

Aos pesquisadores da Embrapa Cristiane Vieira Helm e Ivar Wendling por terem viabilizado o trabalho dentro da unidade.

Aos amigos e colegas da Embrapa: Henrique, Renata, Aline, Fabiane, Jaqueline, Vivien e Laudiane.

Ao amigos e colegas da UFPR: Nayana, Vinícius, Renan, Eduardo, Alexis, Martinha, Magali e Joslaine.

À Jéssica de Cássia Thomazi, por toda ajuda e suporte, pela amizade e palavras de incentivo, sem sua ajuda o trabalho dificilmente conseguiria ser concretizado.

À Larissa Glienke, pela amizade e ajuda, você provou que longe é um lugar que não existe.

À Meira Barestellos por toda paciência e auxílio ao compartilhar seu conhecimento em química.

Aos técnicos da Embrapa: Dayanne, Tiélidy, Décio, Joel, Nide e Vera que viabilizaram o trabalho, além de tornarem meus dias mais alegres e divertidos.

À Luziane Franciscon pelo auxílio durante as análises estatísticas.

Aos professores Drs. Maria Élide, Cícero Deschamps e Noemi Nagata pelas contribuições realizadas durante o exame de qualificação.

À professora Dr. Claudia Regina Xavier, do Departamento de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo carinho, atenção e incentivo desde a minha graduação.

Aos amigos Lúcia e Iris Padilha, Ivaneide Fernandes, Joaquim Oliveira, Lucila Frutos e Azir Pires por todas as orações e conversas, pelo suporte necessário para meu caminhar e recuperação.

Ao DAAD e a Capes pelo suporte financeiro.

À todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho o meu muito obrigada.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda”.

(Joseph Addison)

RESUMO

A *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (erva-mate) tem se destacado como matéria prima para diversos campos industriais, devido a produção de compostos bioativos (metabólitos) que, entre outras propriedades, possuem benefícios medicinais, os quais estão relacionados principalmente, aos compostos fenólicos (e.g. ácidos clorogênicos) e cafeína. Na produção de folhas de erva-mate, a seleção dos plantios clonais tem sido baseada, principalmente, em rendimentos foliar. No entanto, além da produção de biomassa a qualidade das folhas é uma característica importante durante a seleção clonal. Assim, metodologias capazes de fornecer dados em conjunto dos processos que envolvem o metabolismo primário e secundário devem ser utilizadas, para fornecer uma visão geral das condições bioquímicas que envolvem os processos de produção e consumo de compostos bioativos em erva-mate. O objetivo deste trabalho foi usar CG-EM na obtenção do perfil metabólico de erva-mate cultivada em sistema protegido de semi-hidroponia, comparando genótipos diferentes (concentração de cafeína), para avaliar a distribuição dos bioativos frente a fatores como luminosidade, sazonalidade e nutrição, com o intuito de compreender a distribuição dos metabólitos e, futuramente, dar suporte aos programas de melhoramento genético da espécie. Os estudos desse trabalho foram subdivididos em três capítulos. O primeiro capítulo abordará a criação e uso de uma biblioteca de dados para a obtenção de um perfil metabólico via CG-EM/IT usando de software livre AMDIS. Com a construção da biblioteca foi possível a identificação de 237 compostos em extrato vegetal de diferentes tecidos de erva-mate. A aplicação da base de dados foi testada em um estudo de caso para avaliar a influência da poda. A partir do perfil metabólico foi constatado que os compostos que mais sofreram alterações significativas ($p < 0,05$) frente à situação de estresse foram: sacarose, frutose, galactose, ácido clorogênico e neo-clorogênico. Os ácidos clorogênicos foram consumidos após lesão em tecido saudável, para produção de antioxidantes como uma resposta de defesa. No capítulo 2 usando clones diferentes (AC1 e BC1), foi testada influência do ciclo circadiano e da sazonalidade do perfil de metabólitos. Os resultados demonstraram que mudanças na regulação cíclica diária foi menos relevante que a sazonalidade, o que pode estar relacionado com a variação luminosa e a temperatura, a qual é acumulativa e diferentes em cada época do ano. Os ácidos clorogênicos foram regulados pelos ritmos circadianos, e consumidos em alta luminosidade evitando a fotoxidação dos tecidos, sendo que os períodos mais quentes do ano estimulam o consumo destes antioxidantes. A cafeína foi altamente influenciada pela plasticidade fenotípica, sendo que sua máxima produção varia com o genótipo durante o ciclo circadiano, com sua catabolização nos primeiros estímulos luminosos. No Capítulo 3, são descritos os resultados da variação na nutrição nitrogenada (206-1146 mg L⁻¹) foi avaliada e o perfil metabólico foi obtido em tecido foliar e radicular de dois clones comerciais IVA 10 e IVA 34. O perfil metabólico demonstrou que a assimilação de N está ligada ao ciclo de carbono. A adição de N no sistema de nutrição induziu à salinização e, conseqüente produção de osmólitos para proteção dos tecidos, dos quais, o ácido málico, se destaca no clone IVA 34, por ser importante contra ânion na absorção de nitrato, indicando, entre outros fatores, maior adaptabilidade deste clone a acréscimos da nutrição por N. A análise de regressão da cafeína ($p < 0,05$) demonstrou que o seu aumento é proporcional ao acréscimo da concentração das doses de N, e este acréscimo foi independente do genótipo.

Palavras-chave: Perfil metabólico; erva-mate; fenótipo; nutrição; variação de luminosidade; sazonalidade.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St.Hill. (yerba mate) has been outstanding as raw material in different sectors, due to the production of bioactive compounds (metabolites) that, among other properties, have medicinal benefits, which are mainly related to phenolic compounds (e.g. chlorogenic acids) and caffeine. In the production of mate leaves, the selection of clonal plantations has been based mainly on biomass yields. However, in addition to it, the leaf quality is an important feature during clonal selection. Therefore, methodologies capable of providing data in conjunction with processes involving primary and secondary metabolism should be used to provide an overview of the biochemical conditions involved in the production and consumption processes of bioactive compounds in yerba mate. The objective of this work was to use GC-MS to obtain the metabolic profile of yerba mate grown in a protected semi-hydroponic system. Comparing different genotypes (caffeine concentration), to evaluate the distribution of bioactive substances in relation to factors such as luminosity, seasonality and nutrition, in order to understand the distribution of the metabolites and, in the future, to support the breeding programs of the species. This work is subdivided into three chapters. The first chapter will address the creation and use of a data library to obtain a metabolic profile via GC-MS/IT using AMDIS free software. The built library identified 237 compounds in different tissues of plant extracts. The application of the database was tested in a case study to evaluate the influence of pruning. The metabolic profile showed that the most significant changes ($p < 0.05$) were seen in the sucrose, fructose, galactose, chlorogenic and neo-chlorogenic acid. Chlorogenic acids were consumed after injury in healthy tissue, to produce antioxidants as a defense response. In Chapter 2 using clones (AC1 and BC1), the influence of the circadian cycle and the seasonality in the metabolic profile were tested. The results showed that changes in daily cyclic regulation were less relevant than seasonality, which may be related to light variation and temperature, which is cumulative and different at each time of year. The chlorogenic acids were regulated by the circadian rhythms, and consumed in high luminosity, avoiding the photooxidation of the tissues, and the hotter periods of the year, in which a decreasing amount was detected. Caffeine was highly influenced by phenotypic plasticity, and its maximum production varies between genotypes during the circadian cycle, with its catabolization in the first light stimuli. In Chapter 3, nitrogen nutrition ($206-1146 \text{ mg L}^{-1}$) was evaluated and the metabolic profile was obtained in the leaf and radicular tissues of two clones (IVA 10 and IVA 34). The metabolic profile showed that N assimilation was strongly related to the carbon cycle. The addition of N in the nutrition system induced salinization and, consequently, the production of osmolytes to protect tissues. The behavior of malic acid is highlighted in IVA 34 out because it counter ion in the nitrate absorption, indicating a greater adaptability of this clone to nutritional additions of N. The caffeine regression analysis ($p < 0.05$) showed a proportional increase with doses of N, and it was independent of the genotype.

Keywords: Metabolic profile; yerba mate; phenotype; nutrition; luminosity variation, seasonality.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL DE ERVA MATE.....	21
FIGURA 2: ROTA METABÓLICA DE FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	23
FIGURA 3: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	24
FIGURA 4: ROTA METABÓLICA DA FORMAÇÃO DAS METILXANTINAS	26
FIGURA 5: COMPONENTES BÁSICOS DE UM CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA ACOPLADO A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	34
FIGURA 6: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS AGENTES DE SILILAÇÃO UTILIZADOS EM DERIVATIZAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES..	36
FIGURA 7: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE SILILAÇÃO	36
FIGURA 8: ESQUEMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE METOXIMAS.....	37
FIGURA 9: MODELO DA FORMAÇÃO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	39
FIGURA 10: MODELO DA FORMAÇÃO DA ANÁLISE HIERARQUIA DE COMPONENTES (HCA).....	40
FIGURA 11: SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO EM AREIA.....	60
FIGURA 12: ESQUEMA DAS COLETAS REALIZADAS NO TESTE DE PODA.....	61
FIGURA 13: CORRENTE TOTAL DE ÍONS (CTI) DOS EXTRATOS DE DIFERENTES TECIDOS DE <i>I. paraguariensis</i>	68
FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA NO UV-VIS DE RUTINA (A); QUERCETINA (B) E ÁCIDO CLOROGÊNICO (C), COM E SEM EXTRAÇÃO COM CLOROROFORMIO.....	70
FIGURA 15: CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS (CIT) DA ANÁLISE NÚMERO 7 (TABELA 3, PÁG. 59) DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DERIVATIZADOS UTILIZADOS NO ESTUDO	71
FIGURA 16: RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DAS TEMPERATURAS DA ISOTERMA FINAL E DO INJETOR E A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	73
FIGURA 17: ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DE UMA FRUTOSE DERIVATIZADA (METOXIMADA E SILILADA COM 5 GRUPOS TMS)..	74

FIGURA 18: CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS DE UM EXTRATO DE FOLHA ADULTA DE <i>Ilex paraguariensis</i> , COLETADA NO TEMPO INICIAL (0 MIN).....	76
FIGURA 19: ANÁLISE HIERÁRQUICA DAS AMOSTRAS (HCA) DO TESTE DE PODA, OBTIDA ATRAVÉS DA DISTÂNCIA EUCLIDIANA MÉDIA ...	79
FIGURA 20: (A) SCORES DO CONJUNTO DE COMPOSTOS NOS EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS DE <i>I.PARAGUARIENSIS</i> COLETADA NOS DISTINTOS TEMPOS (B) LOADINGS DOS DADOS PARA OS DISTINTOS TEMPOS DE COLETA.....	81
FIGURA 21: HISTOGRAMA COMPARATIVO DOS COMPOSTOS RELEVANTES EM EXTRATO DE TECIDO FOLIAR ADULTO DE <i>I.paraguriensis</i> EM PODA REALIZADA NOS TEMPOS T1 (0 MIN) E T5 (120 MIN).....	82
FIGURA 22: REPRESENTAÇÃO DE UM CICLO CIRCADIANO	93
FIGURA 23: REPRESENTAÇÃO EXPERIMENTAL DAS COLETAS	100
FIGURA 24: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO	101
FIGURA 25: MAPA DE CALOR DOS METABÓLITOS INFLUÊNCIADOS PELO GENÓTIPO (CLONE) E PELA LUMINOSIDADE SEGUNDO TRATAMENTO ESTATÍSTICO	110
FIGURA 26: MAPA DE CALOR DOS METABÓLITOS INFLUÊNCIADOS APENAS PELA LUMINOSIDADE, INDEPENDENTE DO CLONE, SEGUNDO TRATAMENTO ESTATÍSTICO	111
FIGURA 27: (A, C, E) SCORES DO CONJUNTO DE AMOSTRAS DE FOLHAS ADULTAS DOS CLONES AC1 E BC1 DE ERVA-MATE COLETADAS AO LONGO DO DIA. (B, D, F) LOADINGS DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS DOS EXTRATOS).	114
FIGURA 28: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS AÇÚCARES MALTOSE, SACAROSE, GLICOSE E FRUTOSE, NOS DIFERENTES CLONES DE ERVA-MATE FRENTE À DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE .	117
FIGURA 29: HISTOGRAMA COMPARATIVOS DOS HIDRATOS DE AÇÚCARES <i>mio</i> -INOSITOL; GLICEROL E GALACTINOL, NOS DIFERENTES CLONES DE ERVA-MATE FRENTE À DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE	118
FIGURA 30: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS PERCURSORES E DOS ANTIOXIDANTES ESPECÍFICOS DE	

ERVA-MATE NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE.....	120
FIGURA 31: REPRESENTAÇÃO DA FOTO-ISOMERIZAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO	121
FIGURA 32: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO CÍTRICO; ÁCIDO MÁLICO; CAFEÍNA E ALANTOÍNA; NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE.....	122
FIGURA 33: CATABOLIZAÇÃO SIMPLIFICADA DA CAFEÍNA.....	123
FIGURA 34: CORRELAÇÃO ENTRE OS METABÓLITOS CAFEÍNA E ÁCIDO SUCCÍNICO PARA CLONE BC1 FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE.....	124
FIGURA 35: SCORES (A) DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS DE FOLHAS ADULTAS DOS CLONES AC1 E BC1 DE ERVA-MATE COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, EM DOIS HORÁRIOS DO DIA DEPOIS DO NASCER DO SOL (DNS) E ANTES DO PÔR DO SOL (ANS). LOADINGS DOS COMPOSTOS (B).....	125
FIGURA 36: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: SACAROSE; FRUTOSE; GLICOSE E GALACTOSE NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE	132
FIGURA 37: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO CÍTRICO; ALANTOÍNA; ÁCIDO MÁLICO E 2-OXO-ÁCIDO GLUTÁRICO NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE	133
FIGURA 38: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO FERÚLICO E ÁCIDO TREÔNICO NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE	134
FIGURA 39: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO QUÍNICO ; Z-ÁCIDO CAFEICO; E-ÁCIDO CAFEICO; Z-ÁCIDO CLOROGÊNICO; Z-ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO E CAMPFEROL NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE	135

FIGURA 40: HISTOGRAMA COMPARATIVO DA CAFEÍNA NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE	136
FIGURA 41: ASSIMILAÇÃO SIMPLICADA DE NITROGÊNIO AMONIACAL EM AMINOÁCIDOS GLUTAMINA E ASPARAGINA	146
FIGURA 42: ROTA BIOSINTÉTICA E CORRELAÇÕES DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E CARBONO NA PRODUÇÃO DE METABOLITOS	147
FIGURA 43: REPRESENTAÇÃO DA COLETA DE FOLHAS E RAÍZES DE CINCO REPETIÇÕES BIOLÓGICAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO COM CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE NITROGÊNIO	152
FIGURA 44: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO (A) E DERIVATIZAÇÃO (B) DOS TECIDOS VEGETAIS	154
FIGURA 45: MAPA DE CALOR DE TECIDO FOLIAR FRENTE A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO.....	166
FIGURA 46: MAPA DE CALOR DE RAÍZES FRENTE A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO.....	167
FIGURA 47: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO GLUTÂMICO ($P < 0,01$) EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34	170
FIGURA 48: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DA GLICINA E TIRAMINA EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34	170
FIGURA 49: ANÁLISE DE REGRESSÃO DA MANOSE ($P < 0,01$).....	172
FIGURA 50: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO CHIRÓICO ($P < 0,001$) EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34	173
FIGURA 51: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DA CAFEÍNA E ÁCIDO SUCCÍNICO EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34	174
FIGURA 52: ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E POSTERIOR USO NA ROTA DA SAM PARA FORMAÇÃO DE CAFEÍNA	175
FIGURA 53: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO MÁLICO ($P < 0,001$).....	176
FIGURA 54: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DO MIO-INOSITOL	177
FIGURA 55: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO GLICEROL ($P < 0,05$) EM FOLHAS E RAÍZES DE CLONE IVA 34 E ÁCIDO BENZÓICO ($P < 0,05$) EM	

	FOLHAS DOS CLONES IVA 10 E IVA 34 E SOMENTE RAIZ DE IVA 10.....	179
FIGURA 56:	ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DO (E) ÁCIDO CRIPTO-CLOROGÊNICO EM TECIDO FOLIAR E DO ÁCIDO (Z) CLOROGÊNICO EM RAÍZES NOS CLONES IVA 10 E IVA 34.....	181

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS DE ERVA-MATE E SUAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	27
TABELA 2: PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES POR CG-EM	57
TABELA 3: TEMPERATURAS UTILIZADAS NAS TRÊS VARIÁVEIS TESTADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
TABELA 4: PORCENTAGEM RELATIVA MÉDIA DOS METABÓLITOS POLARES IDENTIFICADOS NO EXTRATO DOS DISTINTOS TECIDOS DE ERVA-MATE (CLONE F1).....	67
TABELA 5: RESPOSTA OBTIDA PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURAS OBTIDAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	72
TABELA 6: DETECÇÃO POR CG-EM DOS PADRÕES DERIVATIZADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	75
TABELA 7: COMPOSTOS DERIVATIZADOS E IDENTIFICADOS EM EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS EM TESTE DE PODA DE <i>I.paraguaniensis</i>	77
TABELA 8: COMPOSTOS DERIVATIZADOS DETECTADOS E NÃO IDENTIFICADOS EM EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS EM TESTE DE PODA DE <i>I.paraguaniensis</i>	78
TABELA 9: PADRÕES E REAGENTES UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES. ...	98
TABELA 10: CLONES SELECIONADOS PARA O ESTUDO	99
TABELA 11: COLETAS REALIZADAS PARA TESTAR A SAZONALIDADE	100
TABELA 12: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS CLONES AC1 E BC1 DURANTE ANÁLISE DO CICLO DIURNO / NOTURNO.....	105
TABELA 13: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS CLONES AC1 E BC1 DURANTE ANÁLISE SAZONAL	126
TABELA 14: PADRÕES E REAGENTES UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES.	150
TABELA 15: CLONES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.	151
TABELA 16: SOLUÇÕES DE NUTRIENTES USADA.....	151

TABELA 17: METABÓLITOS ENCONTRADOS E IDENTIFICADOS EM TECIDO FOLIAR DOS DOIS DISTINTOS CLONES TESTADOS IVA 10 (LINHA DE COR BRANCA) E IVA 34 (LINHA DE COR CINZA) E SUA RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA.	157
TABELA 18: METABÓLITOS ENCONTRADOS E IDENTIFICADOS EM RAÍZ DOS DOIS DISTINTOS CLONES TESTADOS IVA 10 (LINHA DE COR BRANCA) E IVA 34 (LINHA DE COR CINZA) E SUA RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA.....	162
TABELA 19: ANÁLISE DE REGRESSÃO DOS METABÓLITOS PARA OS CLONES IVA 10 E IVA 34 NOS DISTINTOS TECIDOS VEGETAIS (FOLHA E RAIZ).....	169

LISTA DE ACRÔNIMOS E SIGLAS

AMDIS	‘Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System’
CG-TOF/IE-EM	Espectrometria de Massas de Tempo de Voo por Eletroionização
CG-EM/TOF	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas de Tempo de Voo
CG-EM/IT	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas por Íon Trap
CL-EM	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
CLR	‘Centered Log Ratio’ – Razão Logarítmica Centrada
HCA	‘Hierarchical Cluster Analysis’ – Análise Hierárquica de Agrupamentos
IE	Impacto de elétrons/elétron ionização
IT	Íon Trap (armadilha de íons)
GLM	‘General Linear Models’ – Modelos Lineares Generalizados
NIST	‘National Institute of Standards and Technology’
PCA	‘Principal Component Analysis’ – Análise de Componentes Principais
PC	‘Principal Component’ – Componente Principal
PLS	‘ <i>Partial Least Squares</i> ’ – Mínimos Quadrados Parciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	21
1.1 <i>Ilex paraguariensis</i> A. ST. HILL.	21
1.1.1 SETOR ERVATEIRO	29
1.2 GENÔMICA FUNCIONAL E A METABOLÔMICA.....	30
1.2.1 OBTENÇÃO DE UM PERFIL METABÓLICO.....	32
1.2.2 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	33
1.2.3 TÉCNICAS DE DERIVATIZAÇÃO	35
1.2.4 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	37
1.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MODELOS LINEARES GENERALIZADOS	40
REFERÊNCIAS.....	42

CAPÍTULO 1

CRIAÇÃO DE BASE DE DADOS DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SEU USO NA OBTENÇÃO DE PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE.....	52
1 INTRODUÇÃO	53
1.1 BASE DE DADOS METABOLÔMICOS OBTIDOS POR CG-EM.....	53
1.2 BASE DE DADOS NO PROGRAMA AMDIS.....	54
1.3 PERFIL METABÓTILO EM DIFERENTES TECIDOS DE ERVA MATE E EFEITO DA PODA NO PERFIL METABÓLITO DE ERVA MATE	54
2 OBJETIVOS.....	56
2.1 OBJETIVO GERAL	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 REAGENTES	57
3.2 SENSIBILIDADE	58
3.3 ANÁLISES DE FLAVONOIDES POR CG-EM E OTIMIZAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	58
3.3.1 EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO	58
3.3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	59

3.4 USO DE DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS PARA A CONFECÇÃO E VALIDAÇÃO DA BASE DE DADOS	60
3.5 ESTUDO DE CASO: ESTABELECIMENTO E SELEÇÃO DAS MUDAS PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PODA.....	60
3.6 COLETA DOS TECIDOS VEGETAIS	61
3.7 EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÕES.....	62
3.8 ANÁLISE POR CG-EM.....	62
3.9 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES E BASE DE DADOS.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ALVO E ANÁLISE DE PERFIL METABÓLICO EM ERVA-MATE.....	65
4.2 INCLUSÃO DE ANÁLISES DE FLAVONOIDES EM PERFIL METABÓLICO POLARES EM TECIDO VEGETAL	69
4.2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	71
4.3 AVERIGUAÇÃO DOS MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO E SUA SENSIBILIDADE NOS SISTEMA DE CG-MS USADO NO ESTUDO	73
4.4 EXPERIMENTO DE ESTRESSE EM TECIDO FOLIAR – PODA E MUDANÇA NO PERFIL METABÓLICO	76
5 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO E DA SAZONALIDADE NO PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE.....	91
1 INTRODUÇÃO	92
1.1 VARIÇÃO FENOTÍPICA.....	95
2 OBJETIVOS.....	97
2.1 OBJETIVO GERAL	97
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97
3 MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.1 REAGENTES	98
3.2 MATERIAL VEGETAL E EXPERIMENTOS	98
3.3 EXTRAÇÃO.....	100
3.4 DERIVATIZAÇÕES.....	101

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	102
3.6 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISE	102
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4.1 RÍTMO CIRCADIANO NA DISTINÇÃO FENOTÍPICA DE ERVA-MATE.....	104
4.2 SAZONALIDADE NA DISTINÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE.....	125
CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS.....	138

CAPÍTULO 3

PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE EM FUNÇÃO DE MUDANÇAS DA FERTIRRIGAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL.....	144
1 INTRODUÇÃO	145
2 OBJETIVOS.....	149
2.1 OBJETIVO GERAL	149
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	149
3 MATERIAIS E MÉTODOS	150
3.1 REAGENTES	150
3.2 ESTABELECIMENTO E SELEÇÃO DAS MUDAS	150
3.3 EXTRAÇÃO.....	152
3.4 DERIVATIZAÇÕES.....	153
3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	154
3.6 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES	155
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	156
CONCLUSÃO	182
REFERÊNCIAS.....	183
PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	187
APÊNDICE A – CRIAÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE COMPOSTOS ALVOS.....	188
APÊNDICE B – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE DE CICLO DIURNO/ NOTURNO DOS CLONES AC1 E BC1.....	193
APÊNDICE C – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE SASONAL DOS CLONES AC1 E BC1.....	198

**APÊNDICE D – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE DO PERFIL
METABÓLICO FRENTE A MUDANÇAS DA FERTIRRIGAÇÃO NA
CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL EM TECIDO FOLIAR E RAÍZES ..201**

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Ilex paraguariensis* A. St. Hill.

A erva-mate *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. é uma espécie nativa da floresta ombrófila mista, de grande importância sócio-econômica para a região sul do Brasil, Paraguai e Argentina (FOWLER; STURION, 2000). Trata-se de uma árvore dióica, subtropical, perene, pertencente à família Aquifoliaceae (SANTOS, 2004), que apresenta altura variável, que quando cultivada atinge de 3 a 5 m, porém, na floresta pode alcançar 25 m de altura. As folhas apresentam limbo obovado e, comumente, têm de 5 cm a 10 cm de comprimento por 3 cm a 4 cm de largura (CARVALHO, 1994).

A família botânica Aquifoliaceae compreende mais de 500 espécies do gênero *Ilex* (GALLE, 1997). As plantas deste gênero incluem árvores decíduas, perenes ou arbustos, tendo sua distribuição geográfica nas regiões tropicais e temperadas de ambos os hemisférios (HU, 1989; GALLE, 1997).

A erva mate é uma espécie de ocorrência natural do Brasil, Argentina, Paraguai e em algumas regiões do Uruguai. No Brasil, tem representantes nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Figura 1) (OLIVEIRA; ROTTA, 1983; MARIA *et al.*, 1997).

FIGURA 1: ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL DE ERVA MATE



FONTE: Adaptado de Brandt e Silva (2014).

A cultura de *I. paraguariensis* constitui-se em um dos sistemas agroindustriais mais antigos da Região Sul do Brasil, ocorrendo de forma nativa em solos ácidos e de baixa fertilidade; sendo o seu produto constituído basicamente por folhas e ramos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

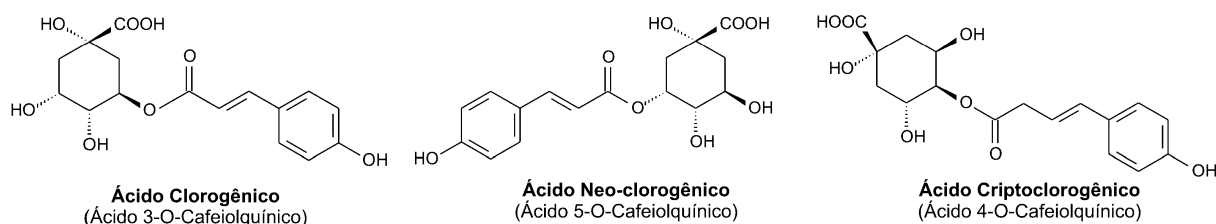
No início da década de 70 o governo brasileiro promoveu a expansão da fronteira agrícola das culturas de soja e trigo para região Sul, ocasionando a perda de grande parte das florestas nativas, inclusive aquelas contendo erva-mate. Parte dos ervais restantes foi esgotada pelo desconhecimento de práticas adequadas para o seu cultivo, o que levou à necessidade de reflorestamento para abastecer o mercado. O sistema implantado para abastecimento foi formado por povoamentos puros (árvores plantadas oriundas por propagação vegetativa, dois anos após o plantio) e ervais nativos (árvores provenientes de sementes por volta dos 5 anos de idade) (PENTEADO, 1995; CARVALHO, 2003).

A erva-mate é popularmente ingerida através do preparo de infusões das folhas verdes secas a quente como chimarrão ou a frio como tererê. Também é consumida como chá, a partir da infusão a quente das folhas tostadas (BRACESCO *et al.*, 2011). O consumo de erva-mate está associado ao seu sabor e a diversos efeitos benéficos à saúde, sendo recentemente produto de exportação para uso na indústria farmacêutica e alimentícia nos Estados Unidos e diversos países da Europa e Ásia (MÁRQUEZ *et al.*, 2013; CARDOZO JR; MORAND, 2016; MATEI *et al.*, 2016).

Seus benefícios medicinais estão relacionados aos constituintes presentes em suas folhas principalmente as xantinas, saponinas e compostos fenólicos (e.g. flavonoides e ácidos clorogênicos) que são oxidados a outros constituintes do alimento ou a componentes celulares e tecidos durante a ingestão (FILIP *et al.*, 2001; VANDERJAGT *et al.*, 2002; BRACESCO *et al.*, 2003; CHANDRA; MEJÍA, 2004).

Os compostos fenólicos são produzidos na rota bioquímica dos arilpropanoides tendo como precursor o aminoácido fenilalanina, sendo que a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) catalisa a desaminação não oxidativa, para produção de ácido cinâmico e seus precursores (Figura 2, TAIZ; ZEIGER, 2013). Na erva-mate, os ácidos *E*-cinâmicos (ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico) podem estar nas suas formas livres ou na forma de mono ou diésteres juntamente com o ácido quínico, tais compostos são conhecidos como ácidos clorogênicos: ácido 3-O-

FIGURA 3: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS



Fonte: O autor (2018).

Os compostos fenólicos presentes nos alimentos podem contribuir para adstringência, amargor, tonalidade, gosto, aroma e estabilidade oxidativa dos produtos. Nas plantas, estes compostos, estão envolvidos em uma grande variedade de funções incluindo proteção contra insetos invasores, ações antimicrobiana e antifúngica, atrativos para os polinizadores, pigmentação e proteção contra raios ultravioleta (NACZK; SHAHIDI, 2006; FRIEDMAN, 2007). Estes compostos podem ser produzidos como resposta após estresse, tal como um corte ao tecido vegetal, o que pode ocasionar a produção de novos metabólitos secundários e também aumento na biossíntese de metabólitos primários (e.g. carboidratos, ácido chiquímico), sendo que o período para início dessa resposta pode variar de minutos a horas após ocorrência do estresse, ou depender ainda da idade cronológica do tecido (e.g. broto ou folhas) (CORRÊA, 2007; WAR *et al.*, 2012; SILVA, 2015).

Os teores em base seca de ácidos 5-cafeoilquinico e cafeico encontrados na erva-mate, variam de 5,70 a 28,00 mg g⁻¹ e 0,14 a 0,37 mg g⁻¹, respectivamente. O conteúdo destes compostos é fator importante para estimular o apelo ao consumo do produto, mas as variações dos seus teores na planta, que podem se dar em função do genótipo, localidade e modo de cultivo, podem ser um problema na seleção de materiais superiores (DUTRA; RIBANI, 2010).

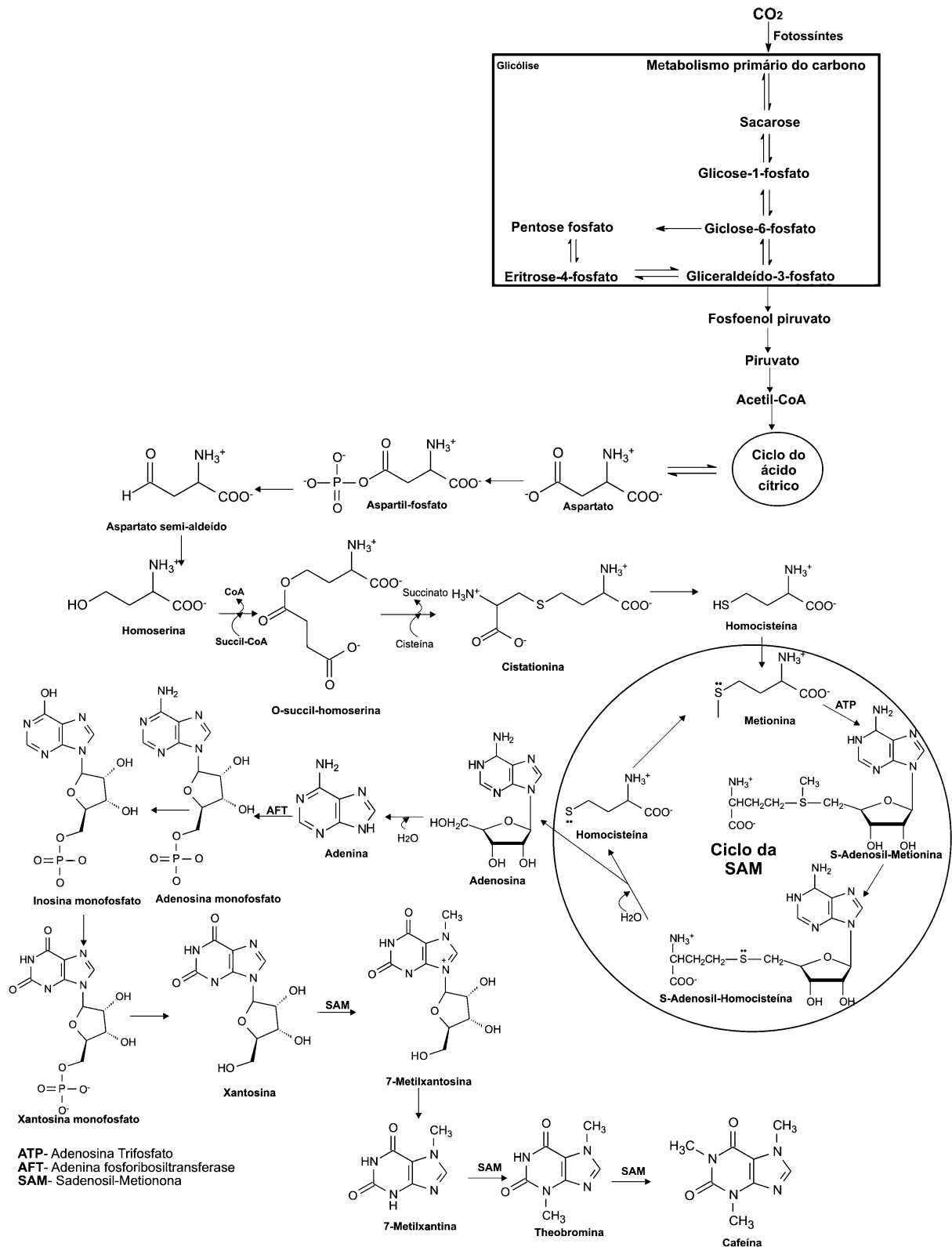
Além dos ácidos clorogênicos, já foram identificados em tecido foliar de erva-mate os flavonoides (e.g. quercetina, campferol e rutina, Tabela 1, pág. 27) (HECK; MEJÍA, 2007). Os flavonoides são pigmentos naturais e antioxidantes, pertencem a uma classe de compostos multifuncionais em todo o reino vegetal (LIU *et al.*, 2015). Os flavonoides são polifenóis acumulados em todos os órgãos e tecidos nas plantas tendo como função proteger os tecidos contra os raios ultravioleta, ação antimicrobiana e antifúngica (TAIZ; ZEIGER, 2013). A estrutura geral de um flavonoide é composta por um esqueleto de 15 átomos de carbono, dividido em duas

partes, um composto fenólico (seis átomos de carbonos) gerado a partir de 3 acetil-coA e um composto arilpropanoide (um ácido cinâmico ou composto relacionado). A estrutura geral é o resultado do acoplamento catalisado por enzima resultando em uma cadeia C6-C3-C6, denominada chalcona (Figura 2), que é precursora para todos os flavonoides (HIGUCHI, 1985; BRAND-GARNYS *et al.*, 2007).

Diferentes alterações na chalcona resultam em diferentes flavonoides que podem sofrer variações químicas, como hidroxilação, hidrogenação metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais de quatro mil compostos flavonóides, que são agrupados em classes. Assim temos grupos, tais como, flavona, flavononas, isoflavona, flavonóis, entre outros (LAZARY, 2010). Ligados à cadeia principal podemos encontrar grupamentos como alquilas, hidroxilas e muito frequentemente açúcares (HIGUCHI, 1985; BRAND-GARNYS *et al.*, 2007).

Os alcalóides da classe metilxantina (e.g. cafeína, teobromina, Figura 4) também são encontrados na erva-mate. Atribuem-se à cafeína e à teobromina as atividades estimulantes das bebidas (SCHUBERT *et al.*, 2006). Os alcaloides são um grupo diversificado de baixa massa molar, que contém nitrogênio em sua composição, encontrado em cerca de 20% das espécies vegetais. A importância desses compostos está relacionada ao papel que desempenham na proteção de plantas contra herbívoros e patógenos (FACCHINI, 2001). As metilxantinas são alcalóides purínicos, derivados do nucleotídeo adenosina, a partir do ciclo da SAM (S-adenosil-metionina) (Figura 4), são encontradas principalmente em órgãos mais jovens e estão localizadas principalmente no vacúolo (ANAYA *et al.*, 2006; ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008; ASHIHARA; OGITA; CROZIER, 2011).

FIGURA 4: ROTA METABÓLICA DA FORMAÇÃO DAS METILXANTINAS



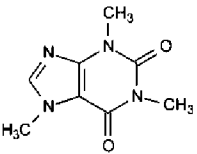
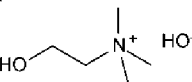
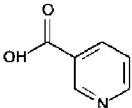
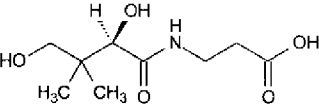
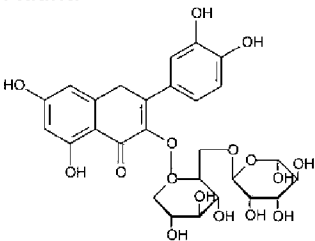
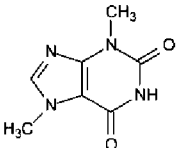
Fonte: O autor (2018).

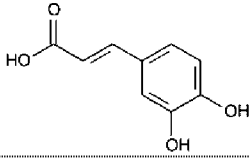
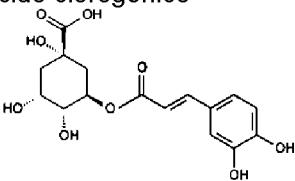
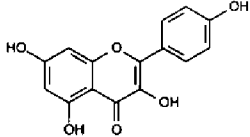
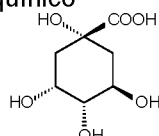
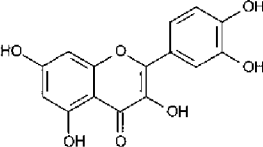
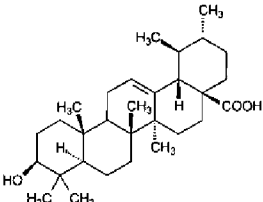
Grande parte dos ervários, no Brasil, são baseados em sistema clonal, que seleciona genotipicamente plantas com características de rápido crescimento, com

respeito à produção de folhas (HIGA, 1985; RICCO *et al.*, 1995; FERNANDES *et al.*, 2000; RESENDE *et al.*, 2000). No entanto, não existem estudos que enfatizem a qualidade das folhas produzidas, ou seja, o melhoramento genético aliado a maior produção de folhas com maior concentração de compostos de interesse industrial.

I. paraguariensis apresenta características fenotípicas de interesse comercial, com potencial de uso na indústria farmacêutica e de alimentos, o que faz o melhoramento genético necessário, não somente para o caráter de produção de massa foliar, mas também voltado para a maior produção de compostos de interesse comercial, que além dos já citados incluem-se a colina, ácido pantotênico e, ácido nicotínico entre outros (Tabela 1).

TABELA 1: COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS DE ERVA-MATE E SUAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.

Composto	Atividade	Referências
Cafeína 	Anticancerígeno Antiobesidade Antioxidante Antitumoral Diurético Estimulante Vasodilatador	Duke, 1992 Gonzales <i>et al.</i> , 1993 Polimilio <i>et al.</i> , 2002 Schinella <i>et al.</i> , 2005 Heck; Mejia, 2007 Bracesco <i>et al.</i> , 2011
Colina 	Previne a diabetes Colinérgica Lipotrópico	Duke, 1992 Opala <i>et al.</i> , 2006 Heck; Mejia, 2007
Ácido Nicotínico 	Colinérgico Hipocolesterolêmico	Filip; Ferraro, 2003 Heck; Mejia, 2007
Ácido Pantotênico 	Antialérgico Antiartítica Antifadiga	Duke, 1992 Heck; Mejia, 2007
Rutina 	Antitumoral Antioxidante Previne a úlcera Vasodilatador Antimutagênico	Duke, 1992 Filip <i>et al.</i> , 2000 Isolabella <i>et al.</i> , 2010
Teobromina 	Diurético Estimulante Miorrelaxante	Gonzales <i>et al.</i> , 1993 Schubert <i>et al.</i> , 2006 Heck; Mejia, 2007 Riachi; De Maria, 2017

<p>Ácido cafeico</p> 	<p>Antioxidante Estimulante Antibacteriano</p>	<p>Duke, 1992 Filip et al, 2001 Schubert et al., 2006</p>
<p>Ácido clorogênico</p> 	<p>Antioxidante Antibacteriano Colinérgica Antitumoral Analgésico</p>	<p>Duke, 1992 Andersen; Fogh, 2001 Filip et al., 2001 Gugliucci; Menini, 2002 Heck; Mejia, 2007 Mejia et al., 2010 Isolabella et al., 2010</p>
<p>Campferol</p> 	<p>Antioxidante Antibacteriano Antitumoral</p>	<p>Heck; Mejia, 2007 Correa et al., 2017 Isolabella et al., 2010</p>
<p>Ácido quínico</p> 	<p>Cicatrizante Anti-inflamatória Anti-hemorrágico</p>	<p>Duke, 1992 Prince; Senthil, 2012 Riachi; De Maria, 2017</p>
<p>Quercetina</p> 	<p>Antioxidante Antialérgico Antitumoral Antiviral Anti-inflamatória</p>	<p>Duke, 1992 Riachi; De Maria, 2017 Isolabella et al., 2010</p>
<p>Ácido ursólico</p> 	<p>Analgésica Antioxidante Antiarrítmico Antitumoral Previne o Alzheimer</p>	<p>Gnoatto et al., 2005 Heck; Mejia, 2007 Riachi; De Maria, 2017</p>

Para programas clonais de reprodução de erva-mate no que diz respeito aos compostos alvo funcional (e.g. cafeína e ácido clorogênicos, Tabela 1), é necessário a hereditariedade de tais componentes, assim é sugerido que estes fenótipos expressos não podem ser alterados na presença de fatores abióticos (e.g. luz, umidade e nutrição) (SIMEÃO *et al.*, 2002).

Recentemente Cardozo e colaboradores (2010) demonstraram pela máxima verossimilhança restrita e a predição de valores genotípicos via melhor predição linear (BLUP) que os teores de cafeína e teobromina foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), dependendo da região de origem, com alta herdabilidade individual ($H^2 > 0,5$). No entanto, ácido clorogênico e ácido cafeico não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$), dependendo da localidade de origem, e com baixa de valores de herdabilidade média ($H^2 < 0,4$). É importante notar que o

conteúdo dos compostos e os valores dos parâmetros genéticos sugeridos apoiam programas de melhoramento para a erva-mate para os teores de cafeína e teobromina.

Os plantios de erva-mate provenientes de sementes apresentam grande heterogeneidade, com reflexos negativos na qualidade do produto final. A utilização da propagação vegetativa para a produção comercial de mudas de erva-mate, originando indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz pode resolver, pelo menos em parte esta limitação, resultando na formação de plantios de alta produtividade e uniformidade, com possibilidade de melhoria da qualidade dos produtos obtidos em relação aos componentes bioativos, na multiplicação de indivíduos resistentes à pragas e doenças, adaptados a sítios específicos e na possibilidade de produção de mudas durante todo o ano, por meio de plantas matrizes mantidas em viveiro. Nesse contexto, a análise do perfil metabólico na erva-mate se mostra interessante na cultura, pois o conhecimento da dinâmica metabólica e a distribuição dos compostos bioativos, bem como, seus metabólitos precursores, pode ser usado para testar suas herdabilidades, o que auxiliará no maior entendimento da distribuição dos compostos em extratos de folhas de materiais selecionados e na certificação de material genético.

1.1.1 Setor ervateiro

A extração de produtos não madeireiros da floresta no Brasil tem mostrado grande importância social, econômica e ambiental, ocorrendo principalmente em pequenas propriedades (FIEDLER *et al.*, 2008). Apesar da grande importância socioeconômica dos produtos não-madeireiros, em geral, há pouca informação sistemática sobre a quantidade, o valor, processos de produção, manuseamento, transformação e comercialização desses produtos (SANTOS *et al.*, 2003).

A situação corriqueira do setor ervateiro é de restrições de preços e de mercado (RESENDE *et al.*, 1999; RUCKER *et al.*, 2003). A tecnologia de modo geral também pode aumentar a competitividade do setor de erva-mate através de estudos técnicos e de pesquisas para fornecerem dados para apoiar decisões de agricultores e indústrias. O setor de erva-mate ainda depende quase exclusivamente de sua comercialização na forma de chimarrão e chá o que representa uma parcela irrisória do mercado (RUCKER *et al.*, 2003). Assim, a pesquisa que leva a novos produtos

pode resultar em formas alternativas de comercialização, o que deve levar ao aumento da produção de emprego e investimento no mercado interno. Portanto, o aumento da qualidade das árvores de clones de erva-mate do programa de melhoramento com relação aos compostos estimulantes e antioxidantes será um passo importante para agregar valor aos produtos da cadeia produtiva da erva-mate.

1.2 GENÔMICA FUNCIONAL E A METABOLÔMICA

O aperfeiçoamento da propagação clonal ocorreu com o advento das tecnologias genômicas durante a década de 80, que geraram uma grande quantidade de dados de sequência de DNA, permitindo uma visão ampla sobre o número de genes que constituem os organismos (SCHAUER *et al.*, 2005). Entretanto, o conhecimento da sequência de genes de um organismo não é suficiente para entender os mecanismos de funcionalidade de uma célula. Como consequência, houve uma mudança de paradigma nas ciências biológicas, que atualmente concentram-se em desvendar a função do gene, ao invés de simplesmente sequenciar o DNA. Assim novos campos surgiram, dentre eles destaca-se a metabolômica (SCHAUER *et al.*, 2005; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

A metabolômica foi definida inicialmente como a detecção de todos os metabólitos de um organismo, da mesma forma que a genômica se refere ao estudo dos genes. Oliver e colaboradores (1998) foram pioneiros ao formularem o conceito da importância de se correlacionar os genes com os produtos de sua expressão (metabólitos). O termo metabolômica foi utilizado por Fiehn e colaboradores (2000), que descreveram-na como a análise quantitativa e compreensiva de todos os metabólitos, o que proporcionaria um melhor entendimento da genômica funcional, isso porque alterações em RNAm nem sempre resultavam em modificações nos níveis de proteínas, que uma vez traduzidas poderiam estar ou não biologicamente ativas. Como consequência, as alterações no transcriptoma ou no proteoma nem sempre correspondiam à alterações fenotípicas (FIEHN *et al.*, 2000; SCHAUER; FERNIE, 2006; ALSEEKH; FERNIE, 2018). A metabolômica atualmente é vista como uma nova área da ciência, e não mais uma abordagem analítica, como uma caracterização do fenótipo sob condições específicas e posterior correlação com seu genótipo (SUMMER *et al.*, 2003). Essa mudança no conceito foi necessária, já que

ainda é impraticável a detecção e quantificação de todos os metabólitos de um organismo em uma única análise (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005).

Os metabólitos desempenham importante papel nas diferentes vias do metabolismo celular, já que sua quantidade dentro de uma célula ou tecido é determinada pela concentração e propriedades das enzimas. Portanto, a quantidade de metabólitos representa uma informação integrativa da função molecular celular que define uma característica fenotípica em resposta a alterações ambientais ou genéticas (FIEHN, 2002; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). A análise do metaboloma tornou-se rotineiramente aplicável a espécies muito diversas como *Populus tremuloides* (álamo), *Arabidopsis thaliana* (erva-estrelada), *Nicotiana tabacum* (tabaco), entre outras, sendo que o perfil metabólico é usado como uma ferramenta de diagnóstico para verificar a resposta da planta a um herbicida, estresses bióticos ou abióticos, na predição de biomassa, na classificação de genótipos, e principalmente no auxílio para decifrar a função de um gene (WAGNER *et al.*, 2003; GULLBERG *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2004; SCHAUER; FERNIE, 2006; ALSEEKH; FERNIE, 2018). No gênero *Ilex* o metaboloma foi utilizado na quimiotaxonomia das espécies (CHOI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2010).

Os metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários e secundários e, esses constituem um conjunto diversificado de compostos e classes químicas, que são caracterizados por uma ampla variação nas propriedades físico-químicas devido à grande variedade de compostos (DUNN; ELLIS, 2005). Os metabólitos primários estão envolvidos nas principais vias metabólicas que ocorrem nas células, e encontram-se dissolvidos no citosol. Entre eles estão os açúcares e seus derivados, ácidos carboxílicos, lipídios e aminoácidos (DIXON, 2001; HALL, 2006). Os metabólitos secundários são uma série de compostos que parecem não terem função direta no crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Esses compostos são divididos em três vias metabólicas principais (acetato, chiquimato e mevalonato) originando os grupos dos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZAIGER, 2013). Na erva mate destacam-se os grupos das metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados quínicos (ácido cafeico e ácido clorogênico) e flavonoides (quercetina, campferol e rutina).

Entre as abordagens analíticas existentes para a análise do metaboloma a técnica de perfil metabólico está entre as mais utilizadas, sendo que esta pode ser direcionada ou não. O método direcionado é a detecção de determinado composto

ou classe de metabólitos, especificamente. Já o perfil metabólico não direcionado, visa à análise de qualquer metabólito presente, sem especificidade, ou seja, esse pode ser primário ou não (FIEHN, 2002; GULLBERG *et al.*, 2004; ALSEEKH; FERNIE, 2018). Esses conceitos também estão ligados com o tratamento dos dados obtidos, ou seja, quanto maior o conhecimento sobre o tipo de metabólitos encontrados, bem como sua quantificação, mais a técnica se aproxima de uma análise direcionada, já a análise mais qualitativa está relacionada com o método não direcionado (KRATSTANOV, 2010).

1.2.1 Obtenção de um perfil metabólico

A análise de um perfil metabólico só é possível quando são executadas algumas etapas fundamentais, sendo todas passíveis de erros experimentais: (i) seleção do organismo, tecido ou célula a ser estudado; (ii) preparação da amostra; (iii) análise dos metabólitos e (iv) tratamento dos dados (FIEHN *et al.*, 2000; SCHAUER *et al.* 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; ALLWOOD, *et al.*, 2009; ALSEEKH; FERNIE, 2018).

- i. A seleção do material de estudo deve ser realizada de forma cuidadosa, já que variações relacionadas à nutrição do organismo, hora e período da coleta, idade e tamanho das amostras, podem interferir na uniformidade e composição da amostra (FIEHN, 2002; ROBETERSON, 2005; ALLWOOD, *et al.*, 2009);
- ii. A etapa de preparação da amostra é importante, pois, ocasiona grande parte dos erros operacionais como a introdução de artefatos analíticos. Para diminuir os erros o primeiro passo é interromper o metabolismo celular, já que os níveis de metabólitos variam rapidamente com alterações ambientais. A mudança drástica de temperatura é utilizada para manutenção das espécies químicas (-40 °C) (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Após, é necessária extração dos metabólitos de interesse, fase crítica, devido, principalmente às características muito diferentes dos metabólitos. A extração é comumente feita com solventes orgânicos (SUMMER, 2008; ALLWOOD, *et al.*, 2009; ALSEEKH; FERNIE, 2018). A concentração do extrato contendo os metabólitos é feita com liofilização ou evaporação a vácuo, e o produto obtido é ressuscitado para análises de RMN e/ou CL-EM, ou derivatizados para análises CG-EM (FIEHN *et al.*, 2000).

- iii. Os métodos analíticos amplamente utilizados para análise de metaboloma são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). A RMN é utilizada principalmente para elucidação estrutural de metabólitos e a CL-EM ou CG-EM para a separação e identificação simultânea de diferentes compostos presentes no metabolismo celular (FIEHN, 2002; KRISHNAN; KRUCER; RATCLIFFE, 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).
- iv. Os dados obtidos pelo emprego das análises instrumentais devem ser convertidos em uma linguagem digital para possibilitar a interpretação dos resultados. Ferramentas estatísticas e analíticas são utilizadas para analisarem um conjunto de dados de CG-EM rapidamente (FIEHN, 2002; LUEDEMANN *et al.*, 2008). Softwares que possibilitam a deconvolução dos cromatogramas da corrente total de íons estão disponíveis no mercado, entre as plataformas disponíveis estão o AMDIS ('Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System'), comumente utilizado por ser disponível livremente no site do NIST (National Institute of Standards and Technology, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>) e, o TagFinder desenvolvido por pesquisadores do Instituto Max Planck de Fisiologia Vegetal Molecular (Potsdam-Golm, Alemanha) (LUEDEMANN *et al.*, 2008).
- v. Os principais métodos estatísticos multivariados empregados são a Análise de Componentes Principais ("Principal Component Analysis" - PCA) e as técnicas de agrupamento ou "clustering" ("Hierarchical Cluster Analysis" – HCA) (FIEHN *et al.*, 2000a; FIEHN, 2002; LUEDEMANN *et al.*, 2008). A PCA aponta os metabólitos que podem ser importantes para a diferenciação do efeito estudado, e quando usado em conjunto com o HCA resulta em uma visão geral aproximada dos padrões gerais de distribuição de metabólitos em um conjunto de amostras. Como extensão destas análises, é importante usar tratamentos estatísticos que possibilitem avaliar a significância das diferenças na distribuição de cada metabólito, sendo a análise de variância (ANOVA) o tratamento mais utilizado (DESBROSSES *et al.*, 2005).

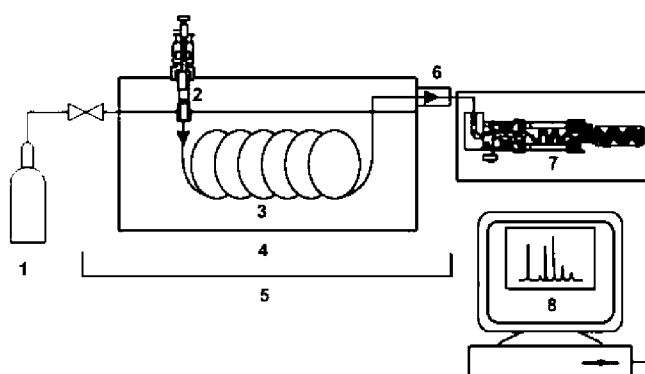
1.2.2 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

O uso de técnicas espectrométricas de análise são comuns na metaboloma, entre as quais se destacam a RMN e a espectrometria de massas. O uso da RMN

permite detecção de uma ampla gama de metabólitos com alta robustez, com preparo simples da amostra e sem que esta seja fracionada (CHOI *et al.*, 2005; KIM *et al.* 2010; MAHROUS; FARAG, 2015). No entanto, a grande desvantagem no uso da técnica está na baixa sensibilidade e dificuldade na resolução de metabólitos primários, além de ser susceptível a problemas de sobreposição de sinal (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; PUTRI *et al.*, 2013). A resolução da EM, através da obtenção de espectros de massas, permite a diferenciação estrutural e caracterização dos compostos, além da separação de misturas complexas quando associado à técnicas cromatográficas (BARSCH; PATSCHKOWSKI; NIEHAUS, 2004; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Entre as técnicas cromatográficas, a cromatografia em fase gasosa (CG) permite a separação dos componentes de extratos orgânicos complexos (voláteis e semi-voláteis), pela interação diferenciada desses componentes com a fase estacionária (um polímero que pode ter várias polaridades) e com a fase móvel. Os compostos são separados por suas diferentes propriedades físico-químicas e interações com a fase estacionária da coluna usando, normalmente, um gradiente crescente de temperatura (AUGENSTEIN, 1999; COLLINS, BRAGA, BONATO, 1993). As partes essenciais de um cromatógrafo em fase gasosa são: injetor, onde a amostra é introduzida; uma coluna capilar que contém a fase estacionária; um forno com controle de temperatura; detector e sistema de fornecimento de um gás de arraste (Figura 5).

FIGURA 5: COMPONENTES BÁSICOS DE UM CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA ACOPLADO A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM), EM QUE: (1) GÁS DE ARRASTE; (2) INJETOR; (3) COLUNA CAPILAR; (4) FORNO; (5) CG; (6) INTERFACE CG-EM; (7) ESPECTRÔMETRO DE MASSAS; (8) AQUISIÇÃO DOS DADOS.



FONTE: O autor (2018).

A espectrometria de massas quando combinada com a técnica de CG, fornece uma alta eficiência de separação de misturas biológicas complexas com alto grau de sensibilidade, uma vez que, no CG-EM, após a sua separação pelo cromatógrafo o composto é ionizado dando origem a um espectro de massa, contendo a razão massa carga (m/z) dos vários íons formados (SCHAUER *et al.*, 2005; FIEHN, 2008).

Os diferentes espectrômetros de massas disponíveis no mercado operam com estratégias similares, possuindo uma fonte de ionização; analisador de massas, que utiliza campos elétricos ou magnéticos para separar e direcionar o transporte dos íons em relação a suas razões m/z e um detector, que amplifica a corrente de íons selecionados no analisador de massas (DASS, 2007).

Existem várias fontes de ionização sendo que a técnica por eletroionização é a mais comum, em que o íon molecular (M^+), geralmente instável sofre quebras parciais, formando novos fragmentos, os quais são separados pela relação de suas massas e distribuídos conforme sua intensidade de formação e normalizados pelo íon base (pico base) (FIEHN, 2008). Esse processo de ionização por impacto de elétrons, em que a carga é geralmente unitária ($z = 1$), auxilia na identificação de substâncias desconhecidas, uma vez que o valor da razão massa/carga (m/z) é igual ao valor da massa molecular do fragmento.

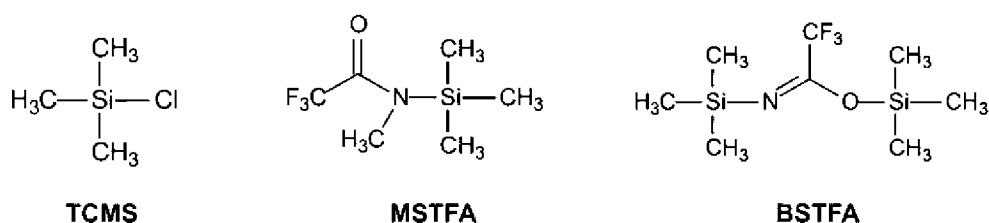
1.2.3 Técnicas de Derivatização

Na análise por CG-EM o composto a ser analisado deve ser volátil e termicamente estável, fato que não ocorre com metabólitos polares, como açúcares e aminoácidos, os quais possuem substituintes polares (*e.g.* OH, NH, COOH), que podem ser degradados ou ainda responsáveis pela baixa resolução das substâncias nas colunas cromatográficas. Assim, estes compostos precisam ser derivatizados antes da análise. As derivatizações são mudanças produzidas na estrutura química das substâncias, que, entre outras finalidades, permitem que as substâncias se tornem mais estáveis termicamente, sejam menos reativas e interajam menos com a fase estacionária (RUIZ-MATUTEA *et al.*, 2011; LUEDEMANN *et al.*, 2008; MEDEIROS, SIMONEIT, 2007; FIEHN, 2002; FIEHN *et al.*, 2000).

Dentre os reagentes de derivatização em CG destacam-se os agentes sililantes, os quais estão envolvidos na substituição nucleofílica de hidrogênios ácidos de agrupamentos de aminas, álcoois e ácidos, pelo grupo trimetilsilano

(TMS). A sililação pode ser realizada com o uso de diferentes reagentes como: cloreto de trimetilsilano (TCMS); N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (Figura 6) (ALLWOOD *et al.*, 2009).

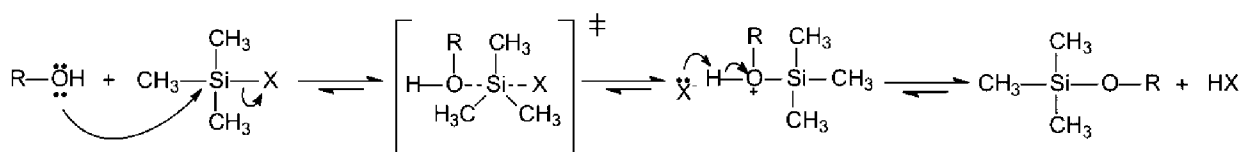
FIGURA 6: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS AGENTES DE SILILAÇÃO UTILIZADOS EM DERIVATIZAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES



Fonte: O autor (2018).

A reação de sililação é conduzida por um bom grupo de saída ligado ao silício, elemento que apresenta elevada afinidade pelo oxigênio. Quanto menor for a basicidade e maior a capacidade de estabilizar a carga negativa no estado de transição biomolecular melhor será o grupo de saída (Figura 7) (MONDEVU; DAVID, 2002; KÜHNEL ET AL., 2007). O MSTFA e o BSTFA são as alternativas mais utilizadas para reações de sililação na obtenção do perfil metabólico (SPRENGER *et al.*, 2016; DETHLOFF *et al.*, 2014; HOFFMAN *et al.*, 2010; ALLWOOD *et al.*, 2009; KOPKA, 2006; JEONG *et al.*, 2004).

FIGURA 7: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE SILILAÇÃO



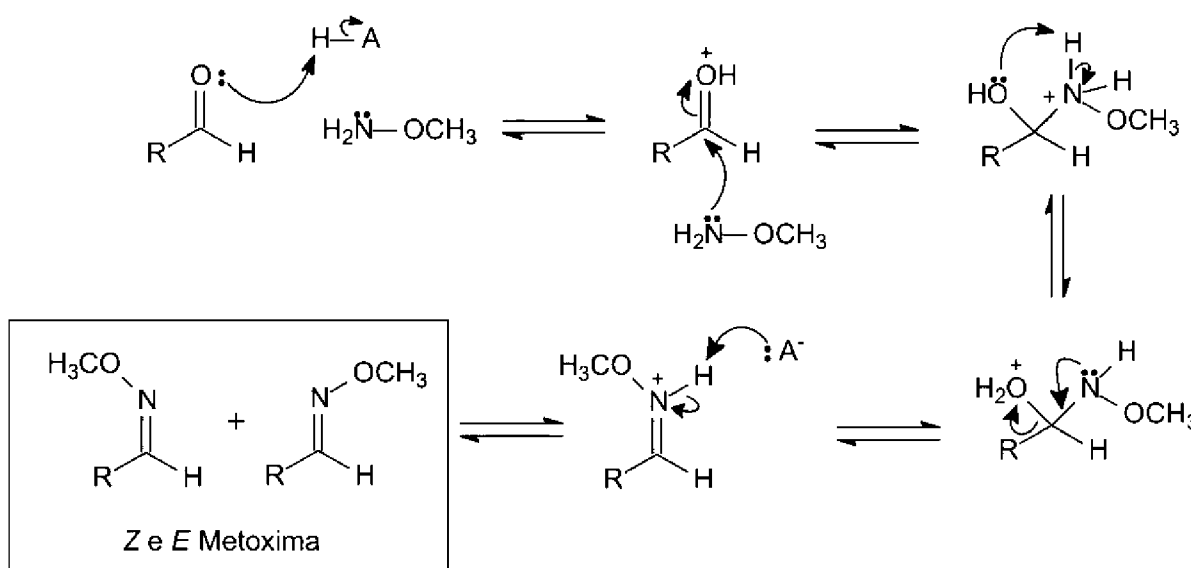
Fonte: O autor (2018).

Para análises de carboidratos é necessário que antes da sililação ocorra a formação de metoximas - também denominadas metiloximas, O-metiloximas ou metoxiaminas - necessário para evitar processos de epimerização e produção de artefatos (DETHLOFF *et al.*, 2014; RUIZ-MATUTEA *et al.*, 2011; FIEHN *et al.*, 2000). A formação de metoximas em piridina é o processo amplamente empregado para a proteção de carbonilas de aldeídos e cetonas durante a obtenção do perfil metabólico (Figura 8) (FALES; LUKKAINEN, 1965). Na metoximação ocorre

formação dos isômeros geométricos *E* e *Z*, sendo que a razão na distribuição dos isômeros é estável e independentemente da quantidade do analito analisado (FUZFAI et al., 2004; FIEHN et al., 2000).

O processo de metoximação, seguido da sililação fornece para os carboidratos um derivado com grupos trimetilsilil (TMS) e metoxima (MEOX) (ALLWOOD, et al., 2009; RUIZ-MATUTE et al., 2011).

FIGURA 8: ESQUEMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE METOXIMAS.



Fonte: O autor (2018).

1.2.4 Análise Multivariada

A análise do perfil metabólico gera uma grande quantidade de dados cromatográficos e espectrográficos, difíceis de serem interpretados devido a sua complexidade e possíveis correlações existentes, uma vez que esses dados têm características multivariadas, isto é, cada amostra é caracterizada por diversos valores, nesse caso por um grande número de espectros de massas (ROESSNER et al., 2001; FIEHN, 2002). Assim, devido à multidimensionalidade destes dados se faz necessária o emprego da análise multivariada, ramo da quimiometria que utiliza dados estatísticos e matemáticos para tratar os dados químicos (GASTEIGER; ENGEL, 2003).

A escala de dados é importante para a análise multivariada, assim esses, dependendo da sua natureza, devem ser tratados previamente (pré-processados), para que sejam uniformizados. Existem diversos tipos de pré-processamentos, sendo que dados provenientes de cromatogramas e espectros de massas

necessitam, normalmente, de alinhamento, suavização da linha de base, normalização e auto escalamento (MATOS *et al.*, 2003).

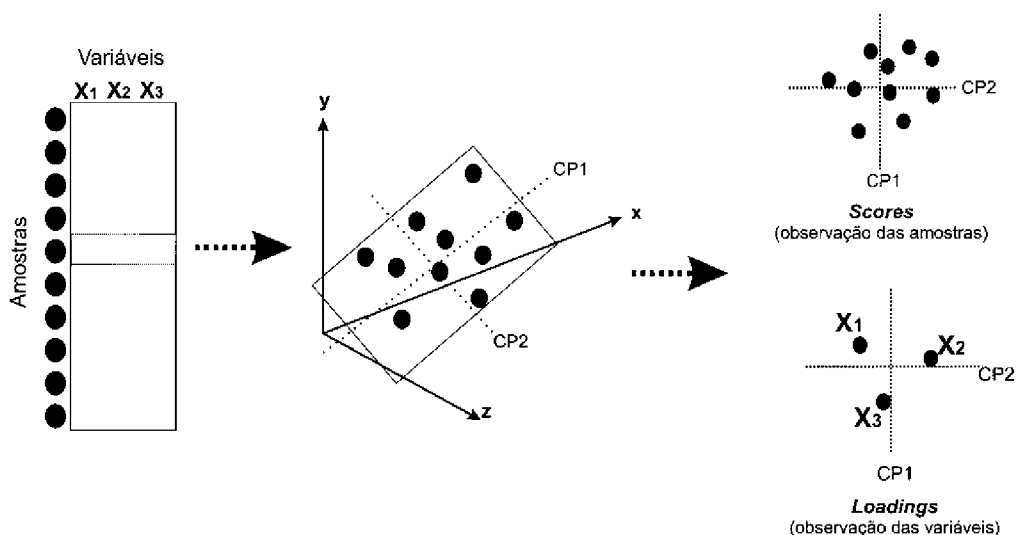
Os diferentes métodos matemáticos e estatísticos aplicados aos dados multivariados podem ser divididos em Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Agrupamentos (do inglês 'Hierarchical Cluster Analysis' - HCA) e Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares* – PLS), as duas primeiras são conhecidas como técnicas multivariadas não supervisionadas, uma vez que são utilizadas para o reconhecimento de padrões e agrupamentos sem que previamente sejam informados quais são os grupos de amostras. Já a técnica de PLS é considerada uma análise supervisionada por agrupar seguindo informações previamente inseridas à análise (WOLD, 1987; JACKSON, 1991; JONSSON *et al.*, 2005).

Resumidamente tanto a PCA quanto o PLS são técnicas de redução de dimensionalidade de dados, em que um conjunto de amostras com dados multidimensionais são reduzidos a componentes principais (PC), para PCA, e em variáveis latentes, para PLS. Ambas as técnicas criam um hiperplano bidimensional, que seria impossível de se observar em um espaço multidimensional, ou seja, são procedimentos algébricos que convertem as variáveis originais (que são tipicamente correlacionadas) num conjunto de variáveis não correlacionadas (linearmente), reduzindo um espaço com N dimensões (em que N é o número de variáveis originais) para um espaço com M dimensões (em que M é tipicamente muito menor do que N), onde a posição de cada objeto no plano é utilizada para relacionar um objeto com outro, assim àqueles que estão mais próximos uns dos outros têm um perfil multivariado semelhante do que os distantes (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006).

Cada componente principal (PC) é gerada para explicar o máximo de variabilidade da parte ainda não explicada, devendo ser ortogonal às PCs anteriores. Assim, a primeira componente sempre mostra a explicação da maior variância dos dados, no entanto quanto maior a complexidade de um conjunto de dados, mais difícil é de explicar as correlações existentes, e, portanto, mais CPs serão necessárias para explicar a variância destes (MATOS *et al.*, 2003; GOWDA *et al.*, 2008). Na PCA os dados originais (matriz X) são decompostos em duas novas matrizes: Y e Z. A matriz Y é a distribuição fatorial dos dados (*scores*), indicando as posições das amostras (linhas de X), no novo sistema de coordenadas dado pelas

PCs, estas são combinações lineares das variáveis originais, sendo a contribuição fatorial (*loadings*) dados pelas colunas da matriz Z (Figura 9) (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010).

FIGURA 9: MODELO DA FORMAÇÃO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).



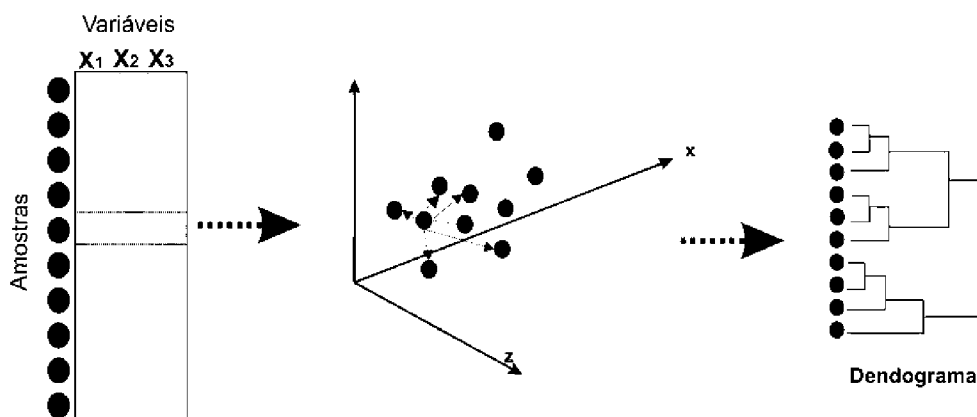
Fonte: Adaptado de Boccard; Veuthey; Rudaz (2010).

O PLS funciona da mesma forma que a PCA, sendo que as variáveis latentes (VL) (análogo as PCs) apontam para a maior variância encontrada sobre determinada informação fornecida ao sistema (e.g. concentração), sendo que essas variáveis escolhidas são preditas através da previsão de erros em um modelo de calibração, utilizando, por exemplo, a validação cruzada (*cross validation*) (WOLD, 2001; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005). Resumidamente PLS relaciona a variância (amostras) com a resposta (dados), procurando maximizar a separação entre grupos de observações.

A HCA é usada normalmente em dados metabolômicos como um método complementar a PCA, já que possibilita o agrupamento das amostras por similaridade, procurando tendências dentro dos agrupamentos (*clusters*) (CAESAR; KVALHEIM; CECH, 2018). Para a HCA a matriz de dados é diminuída em uma dimensão pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo, através da criação de uma nova matriz onde é aplicado uma métrica de similaridade sobre as linhas da matriz inicial, comumente a distância Euclidiana (distância no plano). Diferentes formas são usadas para apresentar os resultados, dentro de dendogramas, sendo que a técnica de '*single linkage*' (conexão simples) a mais difundida, já que utiliza a distância entre as amostras mais

próximas para construir os agrupamentos (Figura 10) (JOHNSON, 1967; EISEN *et al.*, 1998; BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010).

FIGURA 10: MODELO DA FORMAÇÃO DA ANÁLISE HIERARQUIA DE COMPONENTES (HCA)



Fonte: Adaptado de Boccard, Veuthey e Rudaz (2010).

1.2.5 Análise Estatística e Modelos Lineares Generalizados

Para tratamento de dados de metabolômica a análise estatística é usada para extrair informações relevantes dos dados, através de métodos de análise multivariada e univariada. As análises multivariadas, já mencionadas anteriormente, diminuem a dimensão dos dados e ajudam a visualização das interações existentes entre os dados (DESBROSSES *et al.*, 2005). No entanto introduz desafios adicionais e fontes de variabilidade devido ao pré-tratamento e escalamento de dados necessários para analisar todas as variáveis de uma vez. Assim é necessário combinar essas análises com testes univariados, em que as variáveis de estudo (metabólitos) são avaliadas separadamente, para classificar quais são significativamente diferentes. Testes estatísticos como análise de variância (ANOVA), teste t de Student, ou de Mann-Whitney U, são frequentemente utilizados (SUGIMOTO *et al.*, 2012).

A análise de variância é o principal modelo estatístico aplicado em experimentos metabolômicos (DESBROSSES *et al.*, 2005), tal tratamento enfatiza o papel fundamental da repetição e controle local dos experimentos. Em outras palavras, a análise de variância é utilizada quando se quer decidir se as diferenças amostrais observadas são reais (causadas por diferenças significativas nas populações observadas) ou casuais (decorrentes da mera variabilidade amostral).

Já o teste t (teste t de Student e teste t de Welch), avalia se as médias de dois grupos (amostras ou tratamentos) são estatisticamente diferentes em um dado nível de confiança. O teste t é categorizado como um caso especial de ANOVA unidirecional. Por exemplo, o teste t pode ser aplicado quando diferentes grupos de amostras tratadas são comparados com amostras não tratadas (controles). Uma ANOVA permite a comparação dos efeitos de dois ou mais níveis de fatores (KUSANO *et al.*, 2010).

As análises supracitadas só são eficientes quando existe normalidade nos dados, ou seja, o modelo populacional apresenta-se coerente a muitos fenômenos aleatórios, sendo possível uma regressão linear (KUSANO *et al.*, 2011). Quando os dados não apresentam normalidade, os tratamentos estatísticos não paramétricos devem ser utilizados além de outras alternativas que contornem esse problema.

Nesse sentido o modelo linear generalizado (*'generalized linear models'* - GLM) tem sido usado como alternativa aos tratamentos não paramétricos. O GLM é uma grande classe de modelos estatísticos usados para relacionar respostas a combinações lineares de variáveis preditoras independentes. Isso porque os GLM englobam distribuições (e.g. gamma) com menores exigências dos modelos normais aplicados a ANOVA, fornecendo maior flexibilidade em relação aos modelos lineares clássicos, ou seja, tratam os dados com distribuição não normal com maior robustez (KUSANO *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

- ALLWOOD, J. W.; ERBAN, A.; KONING, S.; DUNN, W. B.; LUEDEMANN, A.; LOMMEN, A.; KAY, L.; LÖSCHER, R.; KOPKA, J.; GOODACRE, R. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. **Metabolomics**, v.5, p. 479-496, 2009.
- ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain?. **The Plant Journal**, v. 94, n. 6, p. 933-942, 2018.
- ANAYA, A. L.; CRUZ-ORTEGA, R.; WALLER, G. R. Metabolism and ecology of purine alkaloids. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 2354–2370, 2006.
- ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008.
- ASHIHARA, H.; OGITA, S.; CROZIER, A. Purine alkaloid metabolism. **Plant metabolism and biotechnology**, p. 163-189, 2011.
- AUGENSTEIN, M. W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p.351–371, 1999.
- BARSCH, A.; PATSCHKOWSKI, T.; NIEHAUS, K. Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. **Functional & integrative genomics**, v. 4, n. 4, p. 219-230, 2004.
- BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. *Eclética Química*, v. 30, n. 4, p.51-58, 2005.
- BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant Activity of a botanical Extract Preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA doublestrand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, n.9, p. 379-387, 2003.
- BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.
- BRAND-GARNYS, E. E.; DENZER, H.; MEIJER, H.; BRAND, H. M. et al. Flavonoids: A review for cosmetic application. part two. **Journal of applied cosmetology**, v. 25, n. 4, p. 145-159, 2007.

BRANDT, M.; SILVA, N. S. The harvest of erva mate (*Ilex paraguariensis*) by caboclo population in West and Peixe valley river of Santa Catarina States (Brazil): Breaks with the advancement of private appropriation (decades 1900 to 1940). **Sociedade & Natureza**, v. 26, n. 3, p. 459-469, 2014.

BOCCARD, J.; VEUTHEY, J.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of separation science**, v. 33, n. 3, p. 290-304, 2010.

CARDOZO JR, E. L., DONADUZZI, C. M., FERRARESE-FILHO, O., FRIEDRICH, J. C., GONELA, A., & STURION, J. A.. A Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMPRAPA/CNPFFlorestas, 1994

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, **Coleção espécies arbóreas brasileiras**, v. 1. 2003.

CHANDRA S, DE MEJIA GE. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.3583–3590, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CORRÊA, P. G. **Defesas Foliares em Resposta à Herbivoria em Espécies Lenhosas, Ipojuca-PE**. (Master's Degree). Universidade Federal Rural do Pernambuco. 2007.

CHOI, Y. H., SERTIC, S., KIM, H. K., WILSON, E. G., MICHOPoulos, F., LEFEBER, A. W., VERPOORTE, R. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1237-1245, 2005.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons, USA. 2007.

DESBROSSES, G. G.; KOPKA, J.; UDVARDI, M. K. Lotus japonicus Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for

the Study of Plant-Microbe Interactions. **Plant Physiology**, v.137, p.1302–1318, 2005.

DETHLOFF, F. ERBAN, A., ORF, I., ALPERS, J., FEHRLE, I., BEINE-GOLOVCHUK, O., ... & KOPKA, J. Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry. In: **Plant Cold Acclimation**. Humana Press, New York, NY, p.171-197, 2014.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature London**, v. 411, pp.843-847, 2011.

DU, X.; ZEISEL, S. H. Spectral deconvolution for gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics: current status and future perspectives. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 4, n. 5, p. 1-10, 2013.

DUKE, J.A. **Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants**. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 1992.

DUNN, W. B., ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.4, pp.285-294, 2005.

DUTRA, Fabiana L. Goularte; RIBANI, R. H. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Quim Nova**, v. 33, p. 119-123, 2010.

EISEN, M. B., SPELLMAN, P. T., BROWN, P. O., & BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14863-14868, 1998.

FACCHINI, P. J. Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 29–66, 2001.

FALES, M. H. LUKKAINEN, T. O-Methyloximes as Carbonyl Derivatives in Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance. **Analytical Chemistry**, v.37, n.7, p. 955–957, 1965.

FERNANDES, J.S.C.; USHIWATA, S.; DAMINELLI, R. de M.; GABARDO, J.; KOBIYAMA, M.; MACCARI JUNIOR, A.; PREVEDELLO, C.; RESENDE, R.M.S.; RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A. Estimativas de parâmetros relacionados ao melhoramento genético da erva-mate: possibilidade de seleção precoce. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2000.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Florestais Não Madeireiros: Importância e Manejo Sustentável da Floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 10, n. 2, p. 263-278, 2008.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p.1157-1161, 2000.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v 48, p.155-171, 2002.

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **Metabolomics**. v 27. 261-269 p. 2008.

FILIP, R.; FERRARO, G. E. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*. **European journal of nutrition**, v. 42, n. 1, p. 50-54, 2003.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FILIP, R.; LOTITO, SB.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R.; SEBASTIAN, T.; FERRARO, G.; ANESINI, C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 4, p. 649-655, 2007.

FOWLER J.A. P.; STURION, J.A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. **Comunicado técnico Embrapa Florestas**. Nº 45, p.1-5, 2000.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**. v: 51, p.116 – 134, 2007

FU-ZFA, Z. F.; KATONA, Z. F.; KOVAÄ C.S. E.; R-PERL, I. M. Simultaneous Identification and Quantification of the Sugar, Sugar Alcohol, and Carboxylic Acid Contents of Sour Cherry, Apple, and Ber Fruits, as Their Trimethylsilyl Derivatives, by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7444 – 7452, 2004.

GALLE F. C. **Hollies: the genus Ilex**. Timber Press, Portland, Oregon, USA. pp. 553, 1997.

GASTEIGER, J.; ENGEL, T. (Ed.). **Chemoinformatics: a textbook**. John Wiley & Sons, Germany, 2006.

GIBERTI, G. C. **Aspectos oscuros de la corologia de Ilex paraguariensis St. Hil.** In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. org. Erva mate: Biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 289-300. 1995.

GNOATTO, S. CB; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-725, 2005.

GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; BIANCHI, M. L.; OLIVEIRA, L. C. A.; PEREIRA, E. I.; DALLAGO, R. M. Produção de carvão a partir de resíduo de erva-mate para a remoção de contaminantes orgânicos de meio aquoso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Vol. 31, n. 5, p.1386 – 1391, set./out. 2007.

GONZALEZ, A., FERREIRA, F., VAZQUEZ, A., MOYNA, P., PAZ, E. A. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 217-220, 1993.

GOWDA, G. A. N.; ZHANG, S. C.; GU, H. W.; ASIAGO, V.; SHANAIAH, N.; RAFTERY, D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p.617-633, 2008.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sci**, n.72, p. 279–92, 2002.

GULLBERG, J. A.; PÄR, J. B.; NORDSTRÖM, A. A.; SJÖSTRÖM, M. B.; MORITZA, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.331, p. 283-295, 2004.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, pp.453-468, 2006.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HIGA, R.C.V. Propagação vegetativa da erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. Hil.). In: **Seminário Sobre Atualidades e Perspectivas Florestais**, 10.: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), Curitiba, 1983. Anais. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, pp.121-123. 1985.

HIGUCHI, T. **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. Orlando.: Academic Press, p. 291-299, 1985.

HOFFMAN, D. E. ; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment** . v. 33, pp. 1298–1313, 2010.

HU, C. Y. Holly (*Ilex spp.*). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 5, p. 412 – 487, 1989.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R.; Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JEONG, L. M.; JIANG, H.; CHEN, H. S.; TSAI, C.J.; HARDING, S. A. Metabolic profiling of the sink-to-source transition in developing leaves of quaking aspen. **Plant Physiology**, v.136, p.3364-3375, 2004.

JONSSON, P.; BRUCE, S. J.; MORITZ, T.; TRYGG, J.; SJÖSTRÖM, M.; PLUMB, R., ... & ANTTI, H. Extraction, interpretation and validation of information for comparing samples in metabolic LC/MS data sets. **Analyst**, v. 130, n. 5, p. 701-707, 2005.

KIM, H. KH, S.; WILSON, E. G.; KRICUN, S. D. P.; MEISSNER, A.; GORALER, S., ... VERPOORTE, R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 773-784, 2010.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v.124, p.312-322, 2006.

KRASTANOV, A. Metabolomics—The state of art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1537-1543, 2010.

KÜHNEL, E.; LAFFAN DR, D.D.P.; LLOYD-JONES, G.C.; MARTÍNEZ DEL CAMPO, T.; SHEPPERSON, I.R. SLAUGHTER, J.L. Mechanism of methyl esterification of carboxylic acids by trimethylsilyldiazomethane. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 37, p. 7075-7078, 2007.

KUSANO, M.; Fukushima, A.; Redestig, H.; Kobayashi, M.; Otsuki, H.; Onouchi, H., ... & Saito, K. Comparative metabolomics charts the impact of genotype-dependent methionine accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **Amino acids**, v. 39, n. 4, p. 1013-1021, 2010.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; REDESTIG, H.; & SAITO, K. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1439-1453, 2011.

LAZARY V.M.D. **Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama**. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

LIU, J.; OSBOURN, A.; MA, P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 5, p. 689-708, 2015.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG, K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24, n.5, p.732-737, 2008.

MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: a review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 1, p. 3-15, 2015.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370–1376, 2009.

MÁRQUEZ, V.; MARTÍNEZ, N.; GUERRA, M.; et al. Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 808–815, 2013.

MATEI, M. F.; JAISWAL, R.; PATRAS, M. A.; KUHNERT, N. LC-MSⁿ study of the chemical transformations of hydroxycinnamates during yerba maté (*Ilex paraguariensis*) tea brewing. **Food Research International**, v. 90, p. 307–312, 2016.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: pca e pca de imagens. **Revista Analytica**, v. 06, n. 08, p.38-50, 2003.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B.R.T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 271–278, 2007.

MEJÍA, E. G. DE; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23–34, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523-1542, 2006.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. **Área de distribuição natural de erva mate**. In: Seminário Sobre Atualidades E Perspectivas Florestais: Silvicultura Da Erva-Mate, 10, 1983, Curitiba, Anais.Curitiba: URRPFCS, (EMBRAPA- URRPFCS. Documentos, 25). p. 17-35, 1983.

OLIVER S.G.; WINSON, M.K.; KELL, D.B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, 16, p. 373-378, 1998.

OPALA, T., RZYMSKI, P., PISCHEL, I., WILCZAK, M., & WOZNIAK, J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects-a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **European journal of medical research**, v. 11, n. 8, 343 p., 2006.

PENTEADO, S. R. **Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle**. In: WINGE, H. (Ed.) et al. Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: UFRGS, p. 109-120, 1995.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 13, n. 4, p. 235-241, 2002.

PRINCE, T.M., P.; SENTHIL K., K. Preventive effects of caffeic acid on lipids, lipoproteins and glycoproteins in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **Food research international**, v. 45, n. 1, p. 155-160, 2012.

PUTRI, S. P., YAMAMOTO, S., TSUGAWA, H., FUKUSAKI, E. Current metabolomics: technological advances. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 9-16, 2013.

RESENDE, M. D. V. de. **Predição de valores genéticos, componentes de variância, delineamentos de cruzamento e estrutura de populações no melhoramento florestal**. 1999. 420 f. Tese (Doutorado em Genética) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. (**Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43**). Colombo: Embrapa Florestas, 60 p., 2000.

RIACHI, L. G., DE MARIA, C. A. B., Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

RICCO, R.A.; GURNI W.A.A. **Estudio comparativo de flavonoides en espécies austro sudamericanas del genero *Ilex***. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C., org. Erva-mate: biologia e cultura no cone sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. p.243-249.,1995

ROBETERSON, D. G. Metabolomics in Toxicology a review. **Toxicological sciences**, v.85, p. 809-822, 2005.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**. v.13. p. 11–29 p, 2001.

RUIZ-MATUTEA, A. I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, S.; SANZ, M. L.; MARTINEZ-CASTRO, I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1226–1240, 2011.

SANTOS, A. J.; HILDEBRAND, E.; PACHECO, C. H.; PIRES, P. D. L.; ROCHADELLI, R. Produtos não madeireiros: conceituação, classificação, valoração e mercados. **Revista Floresta**, v. 33, n. 2, p. 215-224, 2003.

SANTOS, K. A. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) em embalagens plásticas. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURGB, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALIE, U.; FORBESE, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC-MS Libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **Herb Letters**, v.579, p.1332-1337, 2005.

SCHAUER, N.; FERNIE, R. A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v.11, n.10, p. 508-516, 2006.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (erva mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SIMEÃO, R. M.; STURION, J. A.; DE RESENDE, M. D. V.; FERNANDES, J. S. C.; NEIVERTH, D. D.; ULBRICH, A. L. Avaliação genética em erva-mate pelo procedimento BLUP individual multivariado sob interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1589-1596, 2002.

SILVA, J. A. G. **Quantificação de metabólitos secundários relacionados à resposta de defesa do cafeeiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. 2015. (Master's Degree). Universidade Federal de Lavras. 2015.

SPRENGER, H. KUROWSKY, C., HORN, R., ERBAN, A., SEDDIG, S., RUDACK, K., ... & HINCHA, D. K. The drought response of potato reference cultivars with contrasting tolerance. **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 11, p. 2370-2389, 2016.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; & TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, 817-836 p., 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabolomics. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 469-479, 2007.

VANDERJAGT, T.J.; GHATTAS, R; VANDERJAGT, D.J.; CROSSEY, M.; GLEW, R.H. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**. v. 70, n. 9, p. 1035-1040, 2002.

VILLAS-BÔAS, S. G; MAS, S.; AKESSON, M. SMEDSGAARD, J. NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectromtry reviews**. v. 24, p. 613-646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX. n. 36, p. 58-69, 2006.

WAGNER, C.; SEFKOW, M.; KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v.62, p. 887-900, 2003.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A., HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU; S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306, 2012.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

CAPÍTULO 1
CRIAÇÃO DE BASE DE DADOS DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA –
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SEU USO NA OBTENÇÃO DE PERFIL
METABÓLICO DE ERVA-MATE

1 INTRODUÇÃO

1.1 BASE DE DADOS METABOLÔMICOS OBTIDOS POR CG-EM

Na obtenção de um perfil metabólico via CG-EM de um extrato vegetal ocorre a detecção de um grande número de metabólitos, o que torna a identificação um processo árduo, e muitas vezes impraticável manualmente, devido ao grande volume de picos cromatográficos, sendo que alguns compostos podem estar coeluídos. Assim o uso de ferramentas analíticas que possibilitem a deconvolução de picos e automatização do processo de identificação é necessário (STREHMEL *et al.*, 2008; SCHAUER *et al.*, 2005; WAGNER; SEFKOW; KOPKA, 2002).

A deconvolução é um passo fundamental para uma análise metabólica não segmentada, já que são extraídos apenas os sinais relevantes de uma mistura complexa de picos dentro de um cromatograma e, além disso, realiza tratamento do ruído, separação do efeito da matriz, possibilitando até mesmo a separação de compostos com baixas concentrações (DU; ZEISEL, 2013).

Existem diferentes Softwares disponíveis para melhorar o processo de identificação de um conjunto de dados de CG-EM de uma amostra, sendo que entre as plataformas disponíveis está o AMDIS ('Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System' (BEHREND; TREDWELL; BUNDY, 2011; MASTRANGELO *et al.*, 2015). O AMDIS é comumente utilizado para tratar dados de metabolômica. Ele é um software aberto disponível no site do NIST (National Institute of Standards and Technology, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>) e, portanto, acessível para os grupos de pesquisa (HUMMEL *et al.*, 2010; BEHREND; TREDWELL; BUNDY, 2011). A grande vantagem do uso do AMDIS está na sua eficiência e precisão na realização de deconvolução espectral e identificação de compostos, além da possibilidade da criação de uma base de dados de compostos alvo de interesse para o usuário (com extensão *.MSL), a qual contém os dados espectrais, informações do índice de retenção (IR) e tempo de retenção (TR) específico para cada composto (STEIN, 1999; MASTRANGELO *et al.*, 2015). No entanto, o AMDIS não é completamente confiável para a quantificação composta, sendo que estratégias alternativas podem ser aplicadas para corrigir e filtrar os dados, como o uso do próprio software utilizado pelo cromatógrafo na

aquisição de dados para obtenção da quantificação dos picos (DETHLOFF *et al.*, 2014).

1.2 BASE DE DADOS NO PROGRAMA AMDIS

A fim de tornar o processo de identificação mais eficiente é necessária a construção de uma biblioteca de compostos alvos para um dado tipo de matriz (e.g. extrato vegetal) e condição de análise próprias (*i.e.* espectro de massas). Tendo em vista que os espectros de massas obtidos de ionização por eletroionização (IE) são reprodutíveis, o que possibilita a comparação de dados experimentais com diferentes bibliotecas disponíveis (HALKET *et al.*, 2005), a inserção de espectro de massas deconvoluído pelo programa, assim como o IR facilita a busca de compostos alvos em um conjunto de picos dentro de um cromatograma. Na análise de metabólitos isso já é um fato e a base de dados GOLM (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de>) construída usando como base as funcionalidades do AMDIS já é empregada em um grande número de trabalhos na identificação de metabólitos. A base de dados do GOLM foi confeccionada pelo grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Joachim Kopka, do Instituto Max Planck, pioneiro no estudo da metabolômica de plantas, e essa possui mais de 2500 espectros de massas obtidos em sistema CG-EM utilizando um espectrômetro de massa de tempo de voo (TOF), incluindo IR para mais de 2000 metabólitos, obtidos de diferentes matrizes vegetais (HUMMEL *et al.*, 2010).

1.3 PERFIL METABÓTILO EM DIFERENTES TECIDOS DE ERVA MATE E EFEITO DA PODA NO PERFIL METABÓLITO DE ERVA MATE

Atualmente as pesquisas envolvendo a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) têm enfatizado a importância da composição química da erva-mate, para apelo comercial do produto tanto com relação ao sabor (e.g. produção de bebidas) quanto com relação à presença de compostos bioativos (e.g. compostos alcaloides metilxantínicos, saponinas e compostos fenólicos) (FILIP *et al.*, 2000). Uma diversidade de produtos tem sido comercializados, incluindo medicamentos (e.g. vazodilatadores, para fadiga e cefaleia (HECK; MEJIA, 2007) e cosméticos (BARROS *et al.*, 2011).

Dentre os metabólitos produzidos pela *I. paraguariensis* se destacam os compostos fenólicos que estão envolvidos em uma grande variedade de funções incluindo proteção contra insetos invasores, ações antibacteriana e antifúngica, atrativos para os polinizadores, pigmentação e proteção contra raios ultravioleta (NACZH; SHAHIDI, 2006; FRIEDMAN, 2007). Estes compostos podem ser produzidos como resposta após estresse, tal como um corte ao tecido vegetal, podendo ocasionar a produção de novos metabólitos secundários e também aumento na biossíntese de compostos pré-existentes (metabólitos primários), sendo o período para início dessa resposta podendo variar de minutos a horas após ocorrência do estresse, e depender ainda da idade cronológica do tecido (e.g. broto ou folhas) (WAR *et al.*, 2012).

O perfil de metabólitos é usado comumente como ferramenta de diagnóstico para verificar a resposta da planta a um herbicida, a classificação de genótipos, estresses bióticos ou abióticos e principalmente no auxílio para decifrar a função de um gene (WAGNER; SEFKOW; KOPKA, 2003; GULLBERG *et al.*, 2004; SCHAUER; FERNIE, 2006). A possibilidade de prever a concentração de bioativos e sua dinâmica de produção e consumo com base na assinatura metabólica de uma planta apresenta a capacidade da utilização de perfis de metabolitos como biomarcadores com alto poder preditivo na seleção de material genético em tenra idade (MEYER *et al.*, 2007). A análise do perfil metabólico para espécies de erva-mate ainda não foi explorada, o que ocasiona dificuldades na identificação da expressão gênica de fenótipos de interesse comerciais, bem como a estabilidade nos teores dos compostos bioativos (biomarcadores) frente a alterações ambientais estressantes, tais como as que ocorrem durante a coleta de tecido foliar ou períodos diferentes de luminosidade. Dessa maneira, o metaboloma tem potencial para prover o conhecimento da dinâmica e distribuição dos compostos bioativos em extratos de folhas, assim como seus metabólitos precursores.

Nesse contexto, metodologias capazes de fornecer dados em conjunto dos processos que envolvem o metabolismo primário e secundário devem ser utilizadas, para fornecer uma visão geral das condições bioquímicas que envolvem os processos de produção e consumo de compostos bioativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Criar uma base de dados para posterior uso na identificação de metabólitos e suas vias metabólicas envolvidas na formação de compostos bioativos da erva-mate.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confecção de base de dados na plataforma AMDIS utilizando diferentes tecidos vegetais (folha jovem e adulta, calo embriogênico e gema mersitemática) de erva mate;
- Testar a base de dados criada na identificação de metabólitos nos diferentes tecidos de erva-mate;
- Averiguação do protocolo tradicional para identificação dos metabólitos de interesse presentes nos tecidos de erva-mate;
- Verificar se os flavonoides e ácidos cafeiolquínicos estão presentes na mesma fase após a extração líquido/líquido dos metabólitos primários;
- Otimizar as condições cromatográficas para a geração do perfil metabólico incluindo os flavonoides;
- Avaliar como o estresse e cortes no tecido podem variar o perfil metabólico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (CAS 24589-78-4), hidrocloreto de metoxiamina (CAS 593-56-6) e solução de padrão de alcanos (C_7H_{16} - $C_{30}H_{62}$) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Piridina (CAS 110-86-1), metanol e clorofórmio de grau CLAE foram obtidos da Merck (BR).

Os padrões com grau de pureza de 97-99% (Sigma-Aldrich, USA) utilizados nas análises foram preparados na concentração de 10 mg mL^{-1} , com exceção dos aminoácidos que foram adquiridos em uma mistura comercial na concentração de $2,5 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$ (Tabela 2).

TABELA 2: PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES POR CG-EM

Composto	Concentração (mg/mL)	Solvente	Composto	Concentração (mg/mL)	Solvente
Aminoácidos			Fosfatados		
Alanina	0,22	HCl	Frutose-6-fosfatase	10,00	H ₂ O
Arginina	0,44	HCl	Glicose-6-fosfatase	10,00	H ₂ O
Ácido Aspárico	0,33	HCl	Açúcares Alcoóis		
Cisteína	0,30	HCl	Glicerol	10,00	MeOH
Ácido Glutâmico	0,37	HCl	Xilitol	10,00	MeOH
Glicina	0,19	HCl	Sorbitol	10,00	MeOH
Histidina	0,39	HCl	Mio-Inositol	10,00	H ₂ O
Isoleucina	0,33	HCl	Manitol	10,00	H ₂ O
Leucina	0,33	HCl	Açúcares		
Lisina	0,37	HCl	Glicose	10,00	H ₂ O
Metionina	0,37	HCl	Sacarose	10,00	MeOH
Fenilalanina	0,41	HCl	Frutose	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)
Prolina	0,29	HCl	Galactose	10,00	MeOH
Serina	0,26	HCl	Arabinose	10,00	MeOH
Teonina	0,30	HCl	Maltose	10,00	MeOH
Tirosina	0,45	HCl	Celobiose	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)
Valina	0,29	HCl	Ácidos		
Triptofano	10,00	MeOH/ NH ₄ OH(5:1)	Ácido Fumárico	10,00	MeOH
Compostos nitrogenados			Ácido Glicérico	10,00	H ₂ O
Espermidina	10,00	MeOH	Ácido Isocitríco	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)
Espermina	10,00	MeOH	Ácido Málico	10,00	MeOH
Putrescina	10,00	H ₂ O	Ácido Chiquímico	10,00	MeOH
Específicos da Erva-mate			Ácido Succínico	10,00	H ₂ O
Ácido nicotínico	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)	Ácido Cítrico	10,00	H ₂ O
Cafeína	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)			
Ácido Clorogênico	10,00	MeOH			
Ácido Quínico	10,00	MeOH			
Ácido Cafeico	10,00	MeOH			
Campferol	10,00	MeOH			
Quercetina	10,00	MeOH			

3.2 SENSIBILIDADE

O procedimento para verificação da resposta analítica dos metabólitos na CG-EM foi realizado partindo-se de uma solução base contendo 400 nmol mL⁻¹ (100 %) de cada padrão (Tabela 2). A partir dessa solução padrão foram preparadas, por diluição, em metanol, novas soluções contendo 80%, 60%, 40%, 20% e 5% da solução base. Em seguida essas foram injetadas e os valores de áreas da razão massa/carga do fragmento característico para cada composto foi observado. A sensibilidade e a quantidade de extrato vegetal usado nas análises posteriores foram verificados a partir da presença ou ausência do composto alvo no cromatograma dos metabólitos nas diferentes soluções.

3.3 ANÁLISES DE FLAVONOIDES POR CG-EM E OTIMIZAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Para incluir a análise de flavonoides e ácidos cafeiolquínicos à análise de metabólitos primários por CG-EM, foi realizado um estudo dividido em três etapas: preparação dos padrões, extração, e planejamento experimental. Os padrões analisados (*i.e.* ácido clorogênico, catequina, quercetina e campferol) no planejamento experimental por CG-EM, foram preparados na concentração de 50 µg mL⁻¹.

3.3.1 Extração e derivatização

Para o teste de extração foram preparadas separadamente soluções de rutina (1,2 mg mL⁻¹), quercetina (1,2 mg mL⁻¹) e ácido clorogênico (2,0 mg mL⁻¹) em solução metanol:água (60:40). A solução foi submetida à análise em um espectrômetro com comprimento de onda na região do Ultra Violeta e Visível (UV-Vis) (Shimadzu, UV-1800), a fim de determinar a resposta antes da extração (100% de composto na fase metanol: água). Em seguida uma alíquota de 2,5 mL da solução foi misturada com 0,75 mL de clorofórmio e agitada em vórtex por 30 segundos. Uma segunda análise da fração metanol: água foi realizada após a extração líquido/líquido. As análises foram realizadas em triplicata. O espectrômetro foi operado em modo de varredura na faixa entre 600 e 200 nm, com uso de cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Para análise por CG-EM a fração polar, contendo os compostos de interesse, foi separada e seca sob vácuo para posteriormente ser metoximada e sililada seguindo o protocolo rotineiramente aplicável à análise de metaboloma por CG-EM (Item 3.7 deste capítulo). A metoximação foi realizada adicionando aos extratos secos 50 µL de uma solução contendo 20 mg de hidrocloreto de metoxiamina diluído em 1 mL de piridina (40°C, 90 min), em seguida para a reação de sililação foi adicionado 50 µL de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) (40 °C, 90 min) nas amostras da etapa anterior. As amostras derivatizadas foram injetadas no CG-EM, conforme condições abaixo.

3.3.2 Planejamento Experimental

O planejamento experimental foi realizado utilizando o software The Unscrambler X 10.2 a fim de avaliar a influência das variações na temperatura do injetor (mínimo 230 °C, máximo 290 °C), temperatura final da isoterma (mínimo 300°C, máximo 320 °C) e temperatura da linha de transferência (mínimo 250 °C, máximo 300 °C), na intensidade de sinal dos compostos nas análises cromatográficas, e assim verificar a melhor condição para a análise de flavonoides e ácidos cafeiolquínicos durante a obtenção do perfil de metabólitos polares por CG-EM. Com um conhecimento prévio do sistema em estudo, foi estabelecido um planejamento fatorial 2³, com repetição do ponto central, totalizando 11 análises cromatográficas, combinando variações entre os valores máximos e mínimos necessários para comprovar a relação entre as respostas e alterações nas variáveis (Tabela 3).

TABELA 3: TEMPERATURAS UTILIZADAS NAS TRÊS VARIÁVEIS TESTADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

Análise	Injetor (°C)	Isoterma Final (°C)	Linha de Transferência (°C)
1	230	300	250
2	290	300	250
3	230	320	250
4	290	320	250
5	230	300	300
6	290	300	300
7	230	320	300
8	290	320	300
9	260	310	275
10	260	310	275
11	260	310	275

3.4 USO DE DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS PARA A CONFECÇÃO E VALIDAÇÃO DA BASE DE DADOS

Uma base de dados deve ser eficiente na identificação e na deconvolução de compostos de uma espécie independentemente do tipo de tecido vegetal usado, assim para verificar a eficiência da base de dados criada na identificação do conjunto de metabólitos em erva-mate, diferentes tipos de tecidos da planta foram utilizados: folhas jovens e adultas, gema meristemática e calo embriogênico.

3.5 ESTUDO DE CASO: ESTABELECIMENTO E SELEÇÃO DAS MUDAS PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PODA

Os experimentos foram realizados na EMBRAPA Florestas, localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil, utilizando o clone comercial F1 proveniente de um programa de melhoramento genético desenvolvido pela EMBRAPA Florestas, o qual possui características silviculturais interessantes, tendo como ponto chave de seleção a maior produção de massa verde (RESENDE *et al.*, 2000).

As mudas utilizadas foram mantidas em um minijardim clonal em sistema semi-hidropônico em canaletão com areia, alocado em casa de vegetação (Figura 11). Na manutenção das mudas, a irrigação por gotejamento foi feita com solução nutritiva (WENDLING; DUTRA, 2008) duas vezes por dia na estação de inverno ($2,5 \text{ L m}^{-2}$ / aplicação) por um período de 4 min e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão ($1,7 \text{ L m}^{-2}$ / aplicação) por um período de 3 min e 6 segundos. A coleta do material vegetal para a análise dos metabólitos foi realizada três meses após a poda de manutenção realizada periodicamente pela equipe técnica da Embrapa Florestas.

FIGURA 11: SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO EM AREIA



Fonte: O autor (2018).

O experimento foi necessário para identificar se podas consecutivas causariam estresse impossibilitando que experimentos futuros (discutidos no capítulo 2) usassem mesma muda para coletas em distintos horários. Assim o teste para avaliar a influência da poda consistiu de cinco repetições biológicas do clone F1 para cada tratamento (C1...C4, Figura 12), com podas das folhas adultas na região média da muda e do galho usando tesoura, realizadas no intervalo de 0 a 120 min, a fim de examinar o efeito na distribuição dos metabólitos ocasionados após um processo de estresse causado por poda. O experimento foi delineado para que todas as amostras fossem coletadas ao mesmo tempo.

FIGURA 12: ESQUEMA DAS COLETAS REALIZADAS NO TESTE DE PODA

Tempo	Repetições biológicas do mesmo clone F1			
	C1	C2	C3	C4
0 min*	○ ○ ○ ○ ○	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●
15 min	○ ○ ○ ○ ○			
30 min		○ ○ ○ ○ ○		
60 min	○ ○ ○ ○ ○		○ ○ ○ ○ ○	
120 min	○ ○ ○ ○ ○			○ ○ ○ ○ ○

○ Amostra biológica coletada (replicata verdadeira).

● * No tempo zero todas as 20 repetições biológicas foram cortadas. Apenas 5 analisadas no tempo 0.

Fonte: O autor (2018).

3.6 COLETA DOS TECIDOS VEGETAIS

Todos os tecidos foram provenientes do clone F1. Para os experimentos, o tecido vegetal foi coletado em cinco repetições biológicas de cada clone. Para coleta do tecido foliar, foram coletados materiais em região mediana da muda e posição intermediária no galho. Em seguida os tecidos foram imediatamente imersos (em até 10 s) em nitrogênio líquido no momento da poda. Os calos meristemáticos foram sedidos pelo laboratório de cultura de tecidos da Embrapa florestas, obtidos a partir de tecido foliar jovem do clone. Após, todos os materiais coletados foram macerados em cadinho com $N_{2(l)}$ e armazenadas a - 80 °C.

3.7 EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÕES

Foram transferidos 100 mg do material vegetal anteriormente congelado e triturado com auxílio de $N_2(l)$, para um tubo de Eppendorf de 2 mL. A este material foi adicionado ribitol (padrão interno) (18 μ L de solução 0,1 μ g/mL) e metanol (1,5 mL) antes da realização da extração, que ocorreu à 70 °C durante 15 min. O tubo Eppendorf, contendo o material vegetal extraído, foi centrifugado durante 3 min à 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio de 5 mL, no qual foram adicionados água (1,5 mL) e clorofórmio (0,75 mL). A solução foi agitada em vórtex (1 min) e os tubos foram centrifugados durante 15 min a 4000 rpm. A fase metanol/água foi separada e transferida para um tubo eppendorf e seca sob vácuo (Concentrador plus - Eppendorf) por 8 horas (FIEHN *et al.*, 2000).

A metoximação foi realizada adicionando no extrato seco 50 μ L de uma solução de 20 mg de hidrocloreto de metoxiamina diluído em 1 mL de piridina (40°C, 90 min.). Na silição foi utilizado 50 μ L de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoracetamida) (40 °C, 90 min.) adicionado sobre os 50 μ L da solução anterior.

3.8 ANÁLISE POR CG-EM

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando injeção automática (TripPlus AS, Thermo) em um cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas de íon trap (Polaris Q, Thermo). As amostras foram injetadas com divisão de fluxo 1:25 (1 min), e separadas através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm Thermo). A separação dos compostos foi feita com a temperatura do injetor à 230 °C, linha de transferência 250 °C, gás de arraste hélio a 1,5 mL.min⁻¹, com fluxo constante e compensação à vácuo. Programação de temperatura do forno: 70 °C, isoterma de 4 min, aquecimento até 320 °C na taxa de 3 °C min⁻¹, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com eletroionização à 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 200 °C.

3.9 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES E BASE DE DADOS

Os cromatogramas gerados pelo software Xcalibur foram transferidos para o software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution, NIST). A partir do processo de deconvolução do AMDIS, os compostos resolvidos foram identificados através de seus espectros de massas, comparação do tempo de retenção com padrões e através do índice de retenção (IR) (plataforma Golm Metabolome Database - <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). A utilização do software AMDIS permitiu a criação de uma base de dados (Apêndice A) com espectros de massas, IR (SCHAUER *et al.*, 2005), nome e grupo a que pertence o composto, permitindo praticidade nas identificações dos compostos já inseridos na biblioteca de espectros de massas.

Os valores do IR para os compostos foram calculados com base na análise de uma mistura n-alcanos com átomos de carbonos entre C₁₁H₂₄ – C₃₀H₆₂, utilizando a Equação 1 (VAN DEN DOLL; KRATZ, 1963).

EQUAÇÃO 1: CÁLCULO DO ÍNDICE DE RETENÇÃO

$$IR = 100n + 100n \left(\frac{t_{Rz} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \right)$$

Nota: n é o número de carbonos do alcano com o tempo de retenção (t_{Rz}) imediatamente anterior ao composto, e t_{Rz+1} o tempo de retenção do alcano localizado imediatamente após o composto avaliado.

Para a determinação da percentagem relativa de cada composto na amostra, adotou-se a soma de todas as áreas produzidas pelo fragmento majoritário de cada composto com sinal:ruído (S:R) > 75, identificados ou não identificados, como sendo 100%, assim a percentagem individual de cada composto foi relacionada com o todo.

Como fator de exclusão ou inclusão de algum composto, dentro de um tratamento, foi adotado o seguinte critério: analisando a quintuplicata o composto foi excluído da análise quando estava presente em 2 ou menos repetições; caso aparecesse em 3 ou 4, a média desses substituiu os dados faltantes para as análises quimiométricas e estatísticas.

Os dados foram transformados para $-\log_{10}$ para os cálculos quimiométricos. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir a dimensão dos dados e, biplots das amostras e variáveis foram gerados. A análise hierárquica dos

dados (HCA) foi realizada para verificar as semelhanças entre as amostras (Uncrumbler X10.2[®]). Os resultados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro Wilk) com $p > 0,05$ (dados normais), com posterior análise de variância (ANOVA) e a comparação entre os tratamentos foram feitos pelo teste de Bonferroni com 5% de probabilidade (GraphPad Prism 5[®]).

A integração das áreas dos picos deconvoluídos dos compostos foi realizada pelo software Xcalibur (Thermo), a partir de um relatório com os dados de identificação gerado no AMDIS. As informações dos compostos detectados foram inseridas em um arquivo 'Processing Setup – Quan' do Xcalibur para que os cromatogramas adquiridos pudessem ter os picos dos compostos identificados e a área integrada com relação ao íon característico específico de cada composto, e assim permitir uma semi-quantificação dos mesmos em relação à área total ou do padrão interno, sendo que neste trabalho o primeiro foi utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ALVO E ANÁLISE DE PERFIL METABÓLICO EM ERVA-MATE

Uma base de dados dentro do AMDIS deve ser eficiente na deconvolução e identificação do conjunto de compostos de preferência em várias matrizes (*i.e.* folhas, gemas e calos). O estudo do perfil metabólico em tecidos diferentes se faz necessário para entender, entre outros fatores, os motivos da dificuldade de propagação da erva mate por estaquia e, ou micro propagação, seja por material adulto, brotos viáveis ou calos (WENDLING, 2004).

Assim, para que o processo de identificação seja eficiente, a construção de uma biblioteca de compostos de vários tipos de matrizes é desejada, no qual certos parâmetros são padronizados (*i.e.* condições de corrida cromatográficas e aquisição de espectro de massas), para minimizar os erros na identificação de compostos (MASTRANGELO *et al.*, 2015). Já que, existem espectrômetros de massa com detectores distintos, este fato pode alterar os dados dos espectros de massa obtidos (*i.e.* abundâncias relativas da razão massa/carga, m/z), e dificultar a detecção de compostos automaticamente (LUEDEMANN *et al.*, 2008), por esse motivo buscou-se no presente trabalho criar uma biblioteca de compostos alvos onde EM usada foi a com detector do tipo íon trap (IT).

Inicialmente, foi confeccionada uma biblioteca de compostos alvo dentro do AMDIS com matrizes distintas de erva mate (gema, calo, folhas adultas e jovens), sendo que uma biblioteca de calibração (*.CSL, Apêndice A) foi gerada com atribuição de um IR específico para cada composto em uma solução de alcanos ($C_{11} - C_{30}$), os quais foram usados para o cálculo do índice de retenção (IR) dos compostos (metabólitos) identificados nas amostras em análise.

Uma vez que o IR do composto era calculado, ele era comparado aos valores armazenados na biblioteca, onde além da correspondência de similaridade dos espectros, o AMDIS atribui uma pontuação de penalidade ao resultado de acordo com a correspondência dos IRs. Assim, quando um valor IR cai fora de uma janela de retenção especificada, o programa calcula a penalidade que afeta o fator mínimo de correspondência e, portanto, a exatidão da identificação (STAIN, 1999).

O uso do IR diminui o risco inerente a uma identificação errônea, já que os IRs têm excelente reprodutibilidade quando a temperatura do forno, o gradiente de temperatura e a coluna são mantidos constantes, fornecendo informações extras para evitar possíveis variações do IR entre valores experimentais e àqueles inseridos na biblioteca aumentando a precisão da identificação, possibilitando assim a identificação de isômeros geométricos com diferentes TR (*i.e.* carboidratos) (WAGNER; SEFKOW; KOPKA; 2003; KIND *et al.*, 2009; MASTRANGELO *et al.*, 2015).

Em resumo, o espectro de massas de fragmentação do composto alvo é combinado com os espectros de massas daqueles inseridos na biblioteca e marcado com uma probabilidade de correspondência que é então melhor resolvida pelo IR medido, possibilitando assim a identificação segura dos compostos presentes. A semi-quantificação através da integração das áreas dos picos dos compostos foram feitas no software Xcalibur (Thermo) a partir do relatório com as informações de identificação (IR e m/z) geradas pelo AMDIS.

A dificuldade na criação da biblioteca de compostos (*MSL, Apêndice A), está nas flutuações da linha de base, inerentes a matrizes, que prejudicam a visualização de componentes com baixa intensidade, o que pode ser corrigido com aumento da relação sinal/ruído (MASTRANGELO *et al.*, 2015). As bibliotecas de dados metabolômicos existentes são baseados em sistemas de CG-TOF/IE-EM (LUEDEMANN *et al.*, 2008) e não em sistemas mais simples (CG-EM/IT). Dificuldades nas comparações espectrais devem existir mas são minimizadas, uma vez que os espectros de massas produzidos através eletroionização (IE), apresentam íons reprodutíveis. A inserção de compostos na biblioteca com o uso de sistema CG-EM/IT a ser criadas foi baseada nas comparações com as bibliotecas existentes utilizando o IR e m/z característicos para cada composto, e quando disponível a confirmação deste foi realizada com comparação com padrões externos (HALKET *et al.*, 2005).

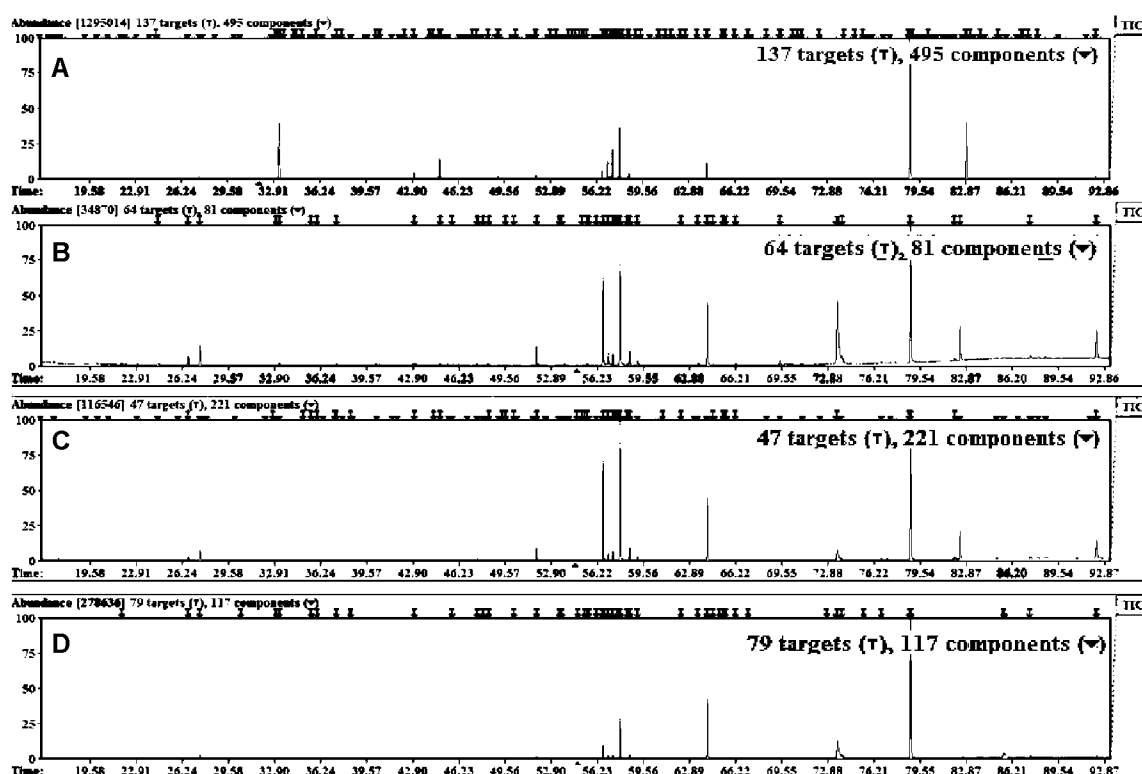
Ao todo 237 compostos foram incluídos na biblioteca de compostos alvos analisando esses diferentes tecidos. Como exemplo, após a inserção dos dados no AMDIS a análise de um extrato de folha adulta do clone F1 possibilitou a detecção de 50 compostos e a identificação de 38 (relação s/r acima de 75, Tabela 4) (Figura 13), o passo a passo da criação da biblioteca pode ser visualizado no Apêndice A deste trabalho.

TABELA 4: PORCENTAGEM RELATIVA MÉDIA DOS METABÓLITOS POLARES IDENTIFICADOS NO EXTRATO DOS DISTINTOS TECIDOS DE ERVA-MATE (CLONE F1).

IR	Composto	Percentagens relativas (%)			
		Folha Jovem	Folha Adulta	Gema	Calo
1137	Alanina	0,70	0,14	0,22	0,03
1205	Valina	-	-	0,02	0,10
1283	Isoleucina	-	0,01	0,02	0,04
1306	Ácido Succínico	0,04	0,02	0,01	-
1313	Ácido Glicérico	0,05	0,02	0,02	0,02
1345	Ácido Fumárico	-	-	0,01	-
1348	Serina	0,11	0,03	0,08	0,68
1372	Treonina	-	0,03	0,02	0,12
1484	Ácido málico	0,26	0,03	1,62	1,87
1506	Prolina	0,04	-	0,04	0,30
1516	Ácido Aspártico	0,09	-	0,17	0,19
1519	Glutamina	0,13	0,02	5,80	4,72
1540	Ácido treônico	0,08	0,10	-	-
1606	Ácido glutâmico	0,22	0,01	0,35	0,15
1624	Xilose-Z-metoxima	-	-	0,02	0,02
1633	Xilose-E-metoxima	0,08	0,02	0,02	-
1748	Xilofuranose	0,08	0,14	0,02	-
1788	Ácido Chiquímico	0,06	-	-	-
1792	ÁcidoGalacturônico	-	0,01	0,03	0,03
1797	Ácido Isocítrico	0,15	0,04	0,23	0,28
1811	Arginina	-	0,02	0,01	-
1849	Ácido Quínico	17,49	3,41	2,00	3,59
1842	Frutose-Z-metoxima	2,21	1,08	10,25	11,54
1852	Frutose-E-metoxima	1,85	0,79	9,55	11,29
1906	Manitol	0,19	0,07	0,06	0,07
1863	Galactose-Z-metoxima	24,18	9,61	16,12	18,29
1843	Cafeína	0,12	0,05	-	-
1864	Galactose- E-metoxima	2,84	1,17	1,56	1,80
1843	Lisina	-	0,01	0,02	0,03
1906	Ácido galacturônico	-	-	0,05	0,08
2061	Mio-Inositol	11,51	14,54	4,04	4,95
2129	Ácido cafeíco	0,26	0,05	0,03	0,03
2270	Glicose-6-fosfatase	-	-	0,05	0,06
2636	Sacarose	24,19	66,22	45,36	37,26
2652	Celobiose	0,57	0,03	0,04	0,06
2933	Galactinol	0,66	0,58	0,01	-
3092	Ácido Clorogênico	6,85	0,72	0,47	0,50

A Figura 13 mostra a corrente total de íons de extrato dos quatro tipos de tecido de erva-mate, gema, calo embriogênico, folha jovem e folha adulta. É possível verificar que a complexidade da matriz é acompanhada por um maior número de componentes (▼) no cromatograma (Figura 13 A). Tecidos vegetais analisados em cultura *in vivo* (Figura 13 A, C e D) tendem a apresentar uma maior complexidade que os cultivados *in vitro* (Figura 13 B).

FIGURA 13: CORRENTE TOTAL DE ÍONS (CTI) DOS EXTRATOS DE DIFERENTES TECIDOS DE *I. paraguariensis*: (A) GEMA; (B) CALO EMBRIOGÊNICO; (C) FOLHA JOVEM E (D) FOLHA ADULTA. NO DETALHE NÚMERO DE (▼)COMPONENTES E (T) TARGETS



FONTE: O autor (2018).

Em sistemas *in vitro* o crescimento é controlado com quantidades conhecidas de nutrientes e reguladores de crescimento em ambiente estéril. O menor número de componentes detectados no AMDIS indica uma menor complexidade da matriz, o que pode estar associada a uma menor ativação das vias metabólicas nesse tipo de sistema (Figura 13 B). Diferentemente do que ocorre em sistemas abertos em que fatores exógenos ao meio não podem ser controlados o que possibilita a ativação de distintas vias metabólicas, e, portanto, uma matriz mais complexa.

Nos cultivos *in vivo*, o domo meristemático (gema) (Figura 13 A), existe um número reduzido de primórdios foliares, ou seja, são tecidos drenos relacionados ao processo produtor-consumidor (“*sink-to-source*”), semelhante a folhas jovens (Figura 13 C) em que todos os tecidos foliares de uma planta sofrem transição de um consumidor (importador de carbono) a uma fonte (exportador de carbono) durante o seu desenvolvimento. O crescimento de uma folha é suportado pelos carboidratos importados de outras fontes na planta (e.g. folha adulta, caule, raiz), que serão biotransformados em outros metabólitos. Quando a folha é completamente expandida os níveis de fotossíntese aumentam até o ponto em que no tecido foliar a

quantidade de carbono acumulado na fotossíntese é maior do que o requisitado de respiração e crescimento, nesta fase a folha torna-se um exportador de carbono (TURGEON, 1989; JEONG *et al.*, 2004). Assim, tecidos jovens (Figura 13 A, C), com maior número de vias metabólicas ativas (e.g. crescimento e proteção), em relação a tecidos adultos (Figura 13D), apresentam maior complexidade da matriz e, por conseguinte maior número de componentes gerados durante a análise.

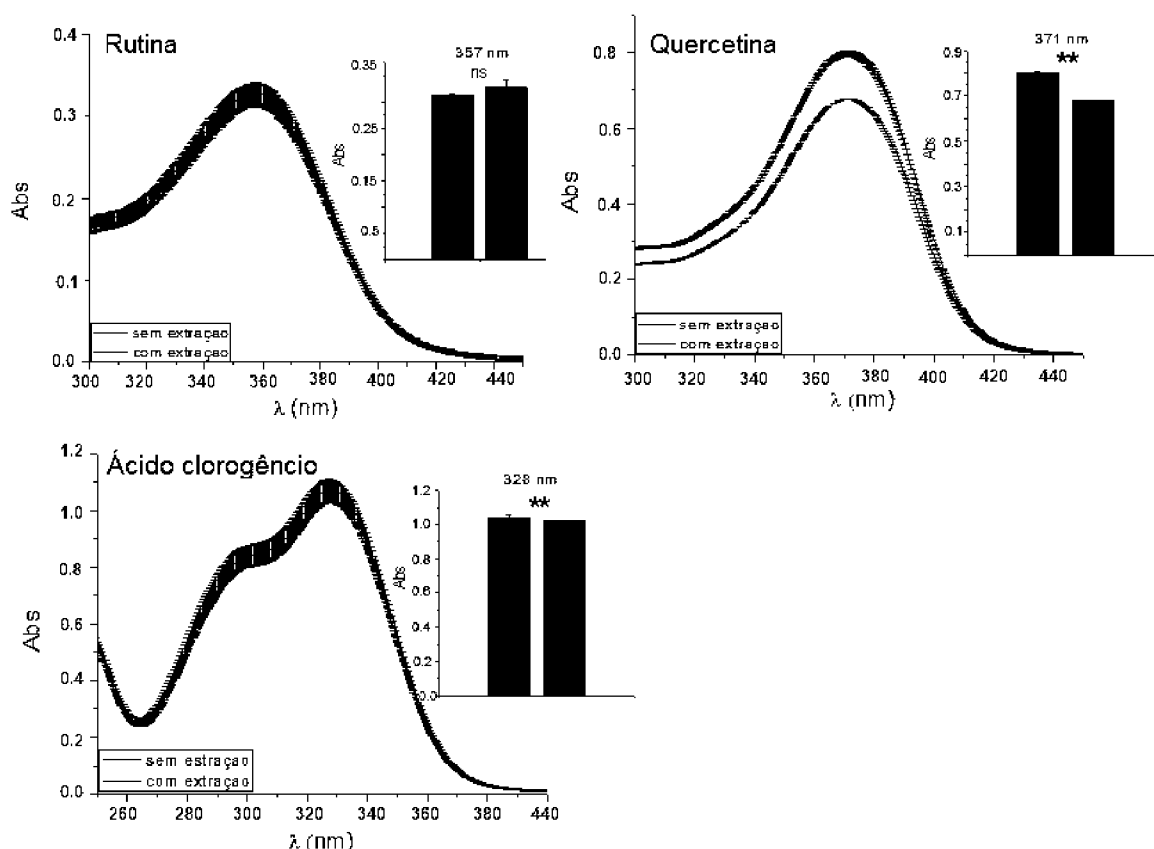
A eficácia da biblioteca na identificação de compostos em diferentes tecidos de erva-mate foi satisfatória, já que possibilitou a identificação de compostos em distintos tecidos, mesmo com a complexidade da matriz, sendo que os compostos presentes foram deconvoluídos, e identificados pelo software (target, T), o que permitiu que a biblioteca criada fosse usada na análise dos extratos de erva-mate.

4.2 INCLUSÃO DE ANÁLISES DE FLAVONOIDES EM PERFIL METABÓLICO POLARES EM TECIDO VEGETAL

A análise do perfil metabólico de erva-mate deve abranger a extração e posterior detecção dos compostos fenólicos por CG-EM. Para tanto se faz necessário que estes compostos permaneçam na mesma fase polar dos demais analitos de interesse. Dentre os métodos existentes a quantificação de compostos pode ser feita utilizando a Espectroscopia do Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Absorção da radiação UV é capaz de promover a transição eletrônica dos elétrons de valência a níveis mais energéticos. A energia absorvida pode ser medida e é proporcional à concentração da substância na amostra (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; GOUVÊA *et al.*, 2014).

Através da diferença de sinal obtida por espectrometria UV-Vis nas análises antes e depois da extração líquido/líquido foi possível verificar que os compostos permanecem em sua totalidade ou em grande parte na fração polar assim como os metabólitos polares já estudados (FIEHN, 2002; JEONG *et al.*, 2004; KOPKA, 2006) (Figura 14), sendo que 100%, 98% e 85% da rutina, ácido clorogênico e quercetina, respectivamente, ficaram retidas na fração polar ($p < 0,05$).

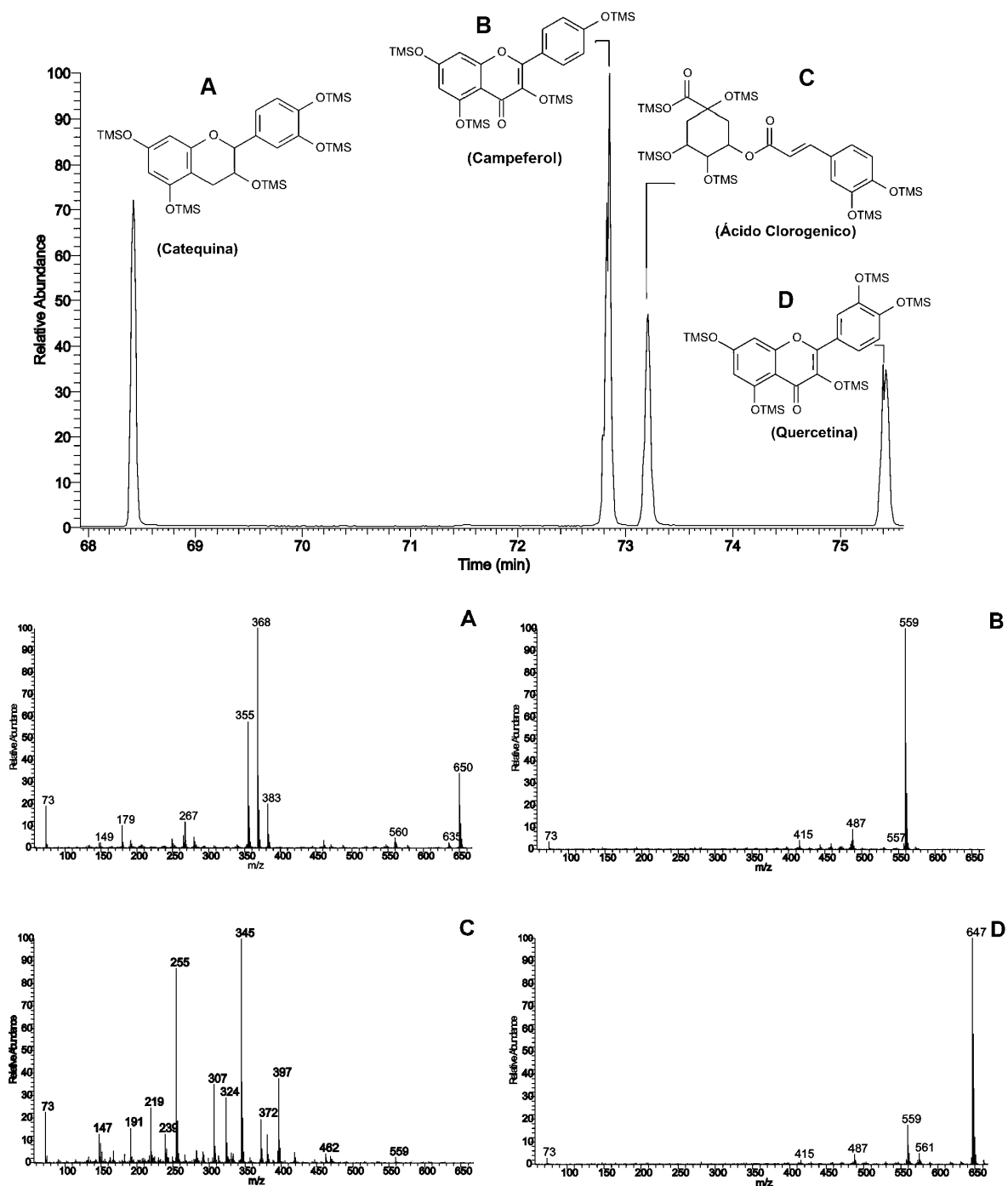
FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA NO UV-VIS DE RUTINA (A); QUERCETINA (B) E ÁCIDO CLOROGÊNICO (C), COM E SEM EXTRAÇÃO COM CLOROROFORMIO. NO DETALHE APLICAÇÃO DE TESTE T (ANOVA) ENTRE OS DOIS MÉTODOS NA ABSORÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DE 357,371 E 328 NM, PARA RUTINA, QUERCETINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO, RESPECTIVAMENTE. OS VALORES DE RECUPERAÇÃO FORAM CALCULADOS COM BASE NA ABSORBÂNCIA NO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO



FONTE: O autor (2018)

Após a análise por UV-Vis os compostos fenólicos (e.g. ácido clorogênico, campferol; catequina e quercetina) foram testados quanto à estabilidade e detecção frente ao uso de CG-EM, empregando o método padrão de extração e derivatização (metoximação seguida de sililação) (FIEHN, 2000). Todos os compostos testados foram detectados em todos os ensaios realizados. Na Figura 15 está apresentado um cromatograma típico e os espectros de massas dos compostos fenólicos, indicando que as etapas de extração e derivatizações não comprometeram a detecção cromatográfica dos compostos e, se presentes em quantidades suficientes, estes poderiam ser detectados em tecido vegetal de erva-mate.

FIGURA 15: CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS (CIT) DA ANÁLISE NÚMERO 7 (TABELA 3, PÁG. 59) DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DERIVATIZADOS UTILIZADOS NO ESTUDO. NO DETALHE OS ESPECTROS DE MASSAS, DESTES COMPOSTOS, ONDE: A) CATEQUINA; B) CAMPFEROL; C) ÁCIDO CLOROGÊNICO E, D) QUERCETINA



FONTE: O autor (2018)

4.2.1 Planejamento Experimental

Em análises cromatográficas para obtenção de um perfil metabólico, vários fatores podem influenciar na resposta desejada, como as temperaturas utilizadas

durante a aquisição dos cromatogramas. Assim, é necessário a otimização destas variáveis, que muitas vezes é realizada por meio de técnicas univariadas, que avaliam o efeito de uma variável por vez. Várias desvantagens estão associadas a esse tipo de processo, tais como, o tempo gasto para otimização e a falta de análise das possíveis interações entre as variáveis, tornando a otimização ineficiente (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). Desta forma processos multivariados são os mais adequados, onde o planejamento experimental fatorial se destaca por avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

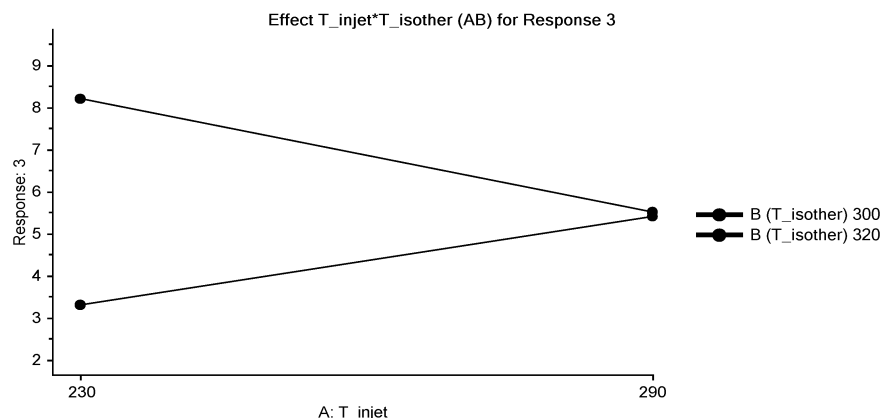
Ao inserir os valores das respostas (áreas dos picos base de cada padrão relativas à do padrão interno) no software Unscrambler 10.2®, dentro dos experimentos previamente estabelecidos no planejamento fatorial 2^3 , foi observado que não há relação entre as respostas obtidas e as alterações de programação das corridas cromatográficas para as distintas classes químicas testadas. Verificou-se apenas um efeito significativo para o ácido clorogênico, o qual foi influenciado para a variável isoterma e interação entre injetor e isoterma (Tabela 5). Com o aumento da temperatura da isoterma há um aumento na abundância relativa do ácido clorogênico. Em relação à interação (efeito de segunda ordem) observa-se um efeito negativo (Tabela 5). Quando a temperatura do injetor é 290°C, independentemente da temperatura da isoterma final não há distinção na obtenção da área cromatográfica para o ácido clorogênicos. No entanto, com temperatura do injetor em 230°C, existe ganho de sinal cromatográfico quando a temperatura da isoterma final é maximizada, ou seja, a melhor resposta é obtida com a menor temperatura do injetor e a maior temperatura de isoterma final (Figura 16).

TABELA 5: RESPOSTA OBTIDA PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURAS OBTIDAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

	Significância	Efeito	p
INJ	NS	-0,29	0,722
ISO	+	2,5097	0,043
LT	NS	1,6996	0,1059
INJ/ISO	-	-2,4046	0,0478
INJ/LT	NS	-0,2527	0,7559
ISO/LT	NS	-2,1361	0,0636

NOTA: INJ= Injetor; ISO = Isoterma; LT= Linha de Transferência; NS = não significativo.

FIGURA 16: RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DAS TEMPERATURAS DA ISOTERMA FINAL E DO INJETOR E A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO



Fonte: O autor (2018).

Dessa forma, as melhores condições cromatográficas de análise foram as demonstradas pelo experimento de número 7 (Tabela 3, pág.59), no qual apresenta temperatura do injetor, isoterma final e linha de transferência de 230°C, 320°C e 300 °C respectivamente, parâmetros já usados para a confecção da plataforma GDM (HUMMEL *et al.*, 2010)

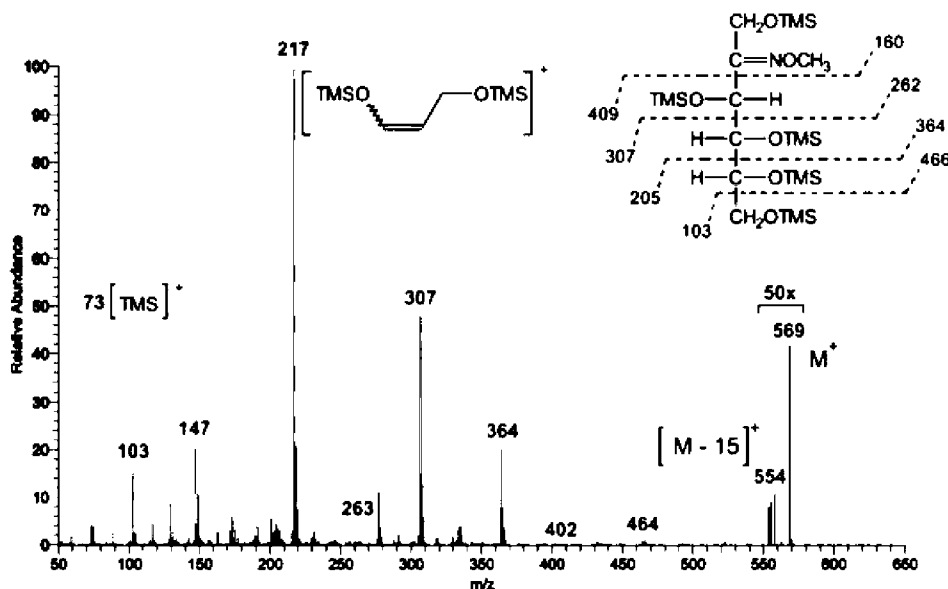
4.3 AVERIGUAÇÃO DOS MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO E SUA SENSIBILIDADE NOS SISTEMA DE CG-MS USADO NO ESTUDO

O método de metoximação seguido de sililação é amplamente empregado para análises de metabólitos vegetais por cromatografia, possibilitando a análise e determinação de compostos de classes químicas diferentes (KOPKA, 2006; STREHMEL, *et al.*, 2008; ALLWOOD, *et al.*, 2009). Os métodos de derivatização empregados, embora eficientes, não garantem que a resposta analítica de um determinado composto ou família de compostos seja semelhante (SCHAUER *et al.* 2005; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011). Neste sentido, investigou-se a sensibilidade da técnica de CG-EM frente a alguns padrões em diferentes concentrações (na faixa de 20 a 400 nmol mL⁻¹, Tabela 6).

Os compostos analisados apresentam como característica os fragmentos [M-15]⁺, correspondente a perda de uma metila radicalar da molécula ionizada e, o fragmento 73 característico da presença do grupo TMS [Si(CH₃)₃]⁺. Para os carboidratos, e seus derivados álcoois, a ionização segue um padrão, em que os

espectros de massas de sacarídeos contendo o grupo pirano se caracterizam pelo fragmento m/z 205, como no caso da glicose. Já os sacarídeos contendo o grupo furano (e.g. frutose) possuem o m/z 217 proeminente (pico base) (LAINE, SWEELEY, 1971; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; RUIZ-MATUTE et al., 2011). Na análise de semi-quantificação foram usados fragmentos característicos de cada composto nas amostras (Tabela 6). A Figura 17 apresenta o espectro de massas característico de uma frutose, açúcar redutor (metoximada e sililada), no qual se notam as distintas fragmentações da molécula, nesse caso será usado o fragmento m/z 217 na semi-quantificação.

FIGURA 17: ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DE UMA FRUTOSE DERIVATIZADA (METOXIMADA E SILILADA COM 5 GRUPOS TMS). NO DETALHE AMPLIAÇÃO DE 50X NA REGIÃO REFERENTE AO ÍON MOLECULAR.



Fonte: O autor (2018).

A análise dos resultados demonstrou que a sensibilidade de detecção é menor para os aminoácidos (Tabela 6). Os compostos arginina, cistina e histidina não foram detectados em nenhuma das concentrações testadas. Os demais aminoácidos, a putrescina, frutose-6-fosfatase e ácido nicotínico não foram detectados em concentrações inferiores a 160 nmol mL^{-1} . Os açúcares, ácidos e os compostos específicos da erva mate com exceção do ácido fumárico ($> 80 \text{ nmol mL}^{-1}$), foram detectados em toda a faixa de concentrações testadas, demonstrando que a técnica é menos sensível para aminoácidos e compostos nitrogenados.

TABELA 6: DETECÇÃO POR CG-EM DOS PADRÕES DERIVATIZADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

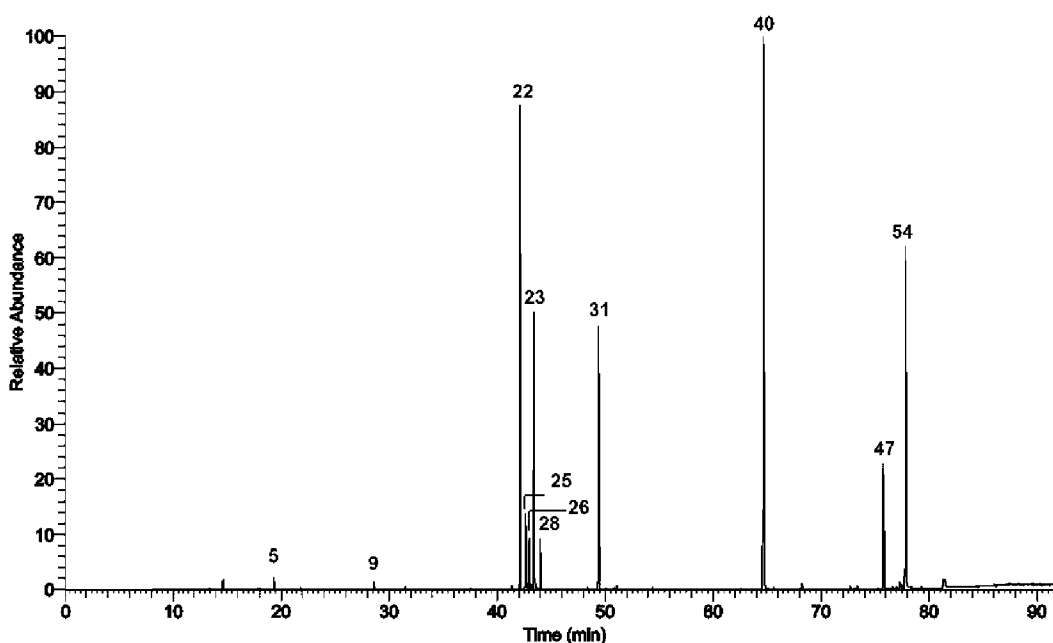
Composto	Fragmentos			Concentração (nmol mL ⁻¹)					
				20 (5%)	80 (20%)	160 (40%)	240 (60%)	320 (80%)	400 (100%)
Alanina	102	291	204	-	+	+	+	+	+
Valina	144	218	246	-	-	+	+	+	+
Serina	204	218	147	-	-	+	+	+	+
Leucina	158	218	232	-	-	+	+	+	+
Isoleucina	158	218	147	-	-	+	+	+	+
Glicina	102	147	176	+	+	+	+	+	+
Treonina	218	117	291	-	+	+	+	+	+
Metionina	176	128	147	-	-	+	+	+	+
Ácido Aspártico	232	147	218	-	-	+	+	+	+
Fenilalanina	264	290	338	-	-	+	+	+	+
Ácido Glutâmico	246	128	147	-	+	+	+	+	+
Lisina	84	156	147	-	-	+	+	+	+
Prolina	142	216	158	-	-	+	+	+	+
Tirosina	232	147	160	-	-	-	-	-	+
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cisteína	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano	202	191	147	-	-	+	+	+	+
Putrescina	174	214	86	-	-	+	+	+	+
Espermidina	144	116	174	-	-	-	-	-	+
Espermina	116	144	174	-	-	-	-	-	+
Glicose-6-fosfatase	204	217	299	-	+	+	+	+	+
Frutose-6-fosfatase	217	315	147	-	-	+	+	+	+
Glicerol	205	147	218	+	+	+	+	+	+
Xilitol	217	147	205	+	+	+	+	+	+
Manitol	319	205	217	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	319	217	205	+	+	+	+	+	+
Inositol	305	318	217	+	+	+	+	+	+
Arabinose	217	204	147	+	+	+	+	+	+
Frutose	217	307	364	+	+	+	+	+	+
Glicose	319	205	147	+	+	+	+	+	+
Galactose	319	147	129	+	+	+	+	+	+
Sacarose	361	437	217	+	+	+	+	+	+
Maltose	217	361	204	+	+	+	+	+	+
Ácido Succínico	147	219	292	+	+	+	+	+	+
Ácido Glicérico	147	189	292	+	+	+	+	+	+
Ácido Fumárico	245	147	115	-	+	+	+	+	+
Ácido Málico	147	233	245	+	+	+	+	+	+
Ácido chiquímico	204	282	372	+	+	+	+	+	+
Ácido Isocitríco	273	147	465	+	+	+	+	+	+
Ácido Cítrico	273	147	347	+	+	+	+	+	+
Ácido nicotínico	180	136	78	-	-	+	+	+	+
Cafeína	194	109	82	-	-	+	+	+	+
Ácido Clorogênico	345	255	397	+	+	+	+	+	+
Ácido Quínico	345	255	372	+	+	+	+	+	+
Ácido Cafeico	219	396	307	+	+	+	+	+	+
Campferol	559	415	487	+	+	+	+	+	+
Quercetina	647	559	561	+	+	+	+	+	+

Nota: Os fragmentos em negrito foram os utilizados para integração da área do pico.

4.4 EXPERIMENTO DE ESTRESSE EM TECIDO FOLIAR – PODA E MUDANÇA NO PERFIL METABÓLICO

O uso da base de dados possibilitou a detecção de 53 compostos e identificação de 27 ($s/r > 70$, $n = 3$) no tecido foliar do clone F1. A análise semi-qualitativa (relação área total), os fragmentos característicos, o IR, o número de substituintes da derivatização dos metabólitos identificados em tecido vegetal, e os testes estatísticos estão apresentados na Tabela 7. A diferença na abundância relativa dos carboidratos e dos compostos específicos da espécie (*i.e.* ácido quínico, (22), e neo-clorogênico, (54)) em relação aos demais compostos pode ser vista claramente na Figura 18.

FIGURA 18: CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS DE UM EXTRATO DE FOLHA ADULTA DE *Ilex paraguariensis*, COLETADA NO TEMPO INICIAL (0 MIN), ONDE: (5) GLICEROL; (9) ÁCIDO MÁLICO; (22) ÁCIDO QUÍNICO; (23) FRUTOSE-*E*-METOXIMA; (25) FRUTOSE-*Z*-METOXIMA; (26) GALACTOSE-*E*-METOXIMA; (28) GLICOSE-*E*-METOXIMA; (31) MIO-INOSITOL; (40) SACAROSE, (47) ÁCIDO CLOROGÊNICO; (54) ÁCIDO NEO-CLOROGÊNICO



Fonte: O autor (2018).

TABELA 7: COMPOSTOS DERIVATIZADOS E IDENTIFICADOS EM EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS EM TESTE DE PODA DE *I. paraguaniensis*

ID	IR	Composto	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	Área relativa (%)							
					Tempo de coleta							
					0 min	15 min	30 min	60 min ^(S)	60 min	120 min ^(S)	120 min	
					T1	T2	T3	T4S	T4	T5S	T5	
1	1098,5	Ácido Malônico	TMS (3)	204 149 131	0,02	0,15	0,02	0,06	-	0,02	0,04	
2	1137,9	L-Glicina	TMS (3)	147 190 220	0,06	0,49	0,14	0,14	0,21	0,17	0,69	
5	1275,6	Glicerol	TMS (3)	205 218 191	-	0,01	0,06	0,03	0,00	0,04	0,19	
6	1316,1	Ácido Succínico	TMS (3)	247 172 147	0,02	-	-	-	-	-	0,03	
7	1331,0	Ácido Glicérico	TMS (3)	292 189 307	0,04	0,03	-	0,03	0,02	0,03	0,05	
9	1491,9	Ácido Málico	TMS (3)	147 233 245	0,04	0,02	-	-	-	0,03	0,16	
10	1516,7	L-Prolina	TMS (3)	156 147 230	0,02	0,02	-	0,04	0,04	0,04	0,25	
11	1522,5	L-Ácido Aspártico	TMS (3)	232 188 149	-	0,03	0,03	-	0,03	-	0,13	
13	1563,0	Ácido Treônico	TMS (4)	220 147 292	0,02	-	-	-	-	0,05	0,02	
14	1621,6	Ácido Glutâmico	TMS (2)	249 230 147	0,19	0,06	0,10	0,03	0,30	0,11	0,36	
15	1657,7	(E) Ribose	MEOX (1) TMS (4)	217 307 277	-	-	-	-	-	-	0,05	
16	1679,5	L-Asparagina	TMS (3)	217 450 232	-	0,01	-	-	-	-	0,02	
18	1768,6	Glucopirranose	MEOX (1) TMS (5)	217 147 307	0,01	0,01	0,02	-	-	0,03	0,09	
20	1816,2	Ácido Chiquímico	TMS (4)	204 254 372	-	-	-	-	-	-	0,01	
21	1831,6	Cafeína	-	194 109 165	0,43	0,32	0,42	0,17	0,15	0,28	0,90	
22	1853,7	Ácido Quínico*	TMS (5)	345 255 372	14,72 ^a	13,21 ^a	11,02 ^a	16,27 ^a	15,11 ^a	9,16 ^b	6,21 ^b	
23	1868,3	Frutose -E- metoxima*	MEOX (1) TMS (5)	217 307 364	2,89 ^a	6,48 ^b	15,67 ^c	11,46 ^c	8,17 ^b	8,13 ^b	23,30 ^e	
25	1878,4	Frutose -Z- metoxima*	MEOX (1) TMS (5)	217 307 364	2,04 ^a	4,46 ^a	11,50 ^b	8,27 ^b	6,10 ^c	5,95 ^a	18,36 ^d	
26	1891,3	Galactose E- metoxima*	MEOX (1) TMS (5)	319 147 129	5,28 ^a	11,03 ^b	29,79 ^c	24,07 ^c	13,19 ^b	11,38 ^b	27,62 ^c	
28	1908,7	Glicose E- metoxima	MEOX (1) TMS (5)	319 205 147	0,69	0,73	5,64	1,87	2,45	2,33	6,58	
31	2082,2	Mio-Inositol*	TMS (6)	305 318 217	7,34 ^a	15,03 ^b	8,05 ^a	8,35 ^a	5,56 ^c	8,34 ^a	10,28 ^a	
35	2135,9	Ácido Cafeico	TMS (5)	219 396 381	0,25	0,13	0,02	0,03	-	0,98	0,10	
40	2629,0	Sacarose*	TMS (8)	361 437 217	38,02 ^a	36,28 ^a	11,93 ^b	22,71 ^c	31,35 ^a	35,69 ^a	0,04 ^d	
47	3100,2	Ácido 3-Cafeiolquínico*	TMS (6)	345 255 397	5,60 ^a	0,92 ^b	0,98 ^b	0,47 ^b	2,32 ^a	2,48 ^a	0,07 ^c	
48	3119,9	Quercetina	TMS (5)	204 547 361	0,02	0,02	-	-	0,01	0,02	0,03	
50	3149,8	Ácido 4-Cafeiolquínico	TMS (5)	575 193 487	0,02	-	-	-	-	-	-	
54	3187,7	Ácido 5-Cafeiolquínico *	TMS (6)	307 345 255	19,34 ^a	8,90 ^b	2,28 ^c	1,92 ^c	13,87 ^b	10,06 ^b	0,29 ^c	

NOTA: (S) Poda em sequência. No detalhe aplicação de teste t (ANOVA), onde os compostos com *, p<0,01, a,b,c,d referem-se as diferenças estatísticas observadas. Os fragmentos em negrito foram os utilizados para integração da área do pico.

Além dos compostos identificados vinte e seis compostos não identificados foram diferenciados e quantificados com base nos dados espectrais e tratados estatisticamente, sendo que estes não apresentaram diferença significativa entre os distintos tempos analisados (Tabela 8). As dificuldades em identificar os compostos foram relacionadas a três fatores principais: (i) efeito matriz ocasionado pela grande quantidade e complexidade dos compostos no extrato, o que causou uma interferência nos espectros de massas, (ii) a difícil relação entre a substância e seu IR, quando da presença de isômeros e, (iii) falta de estudos na área de metabolômica com espécies florestais.

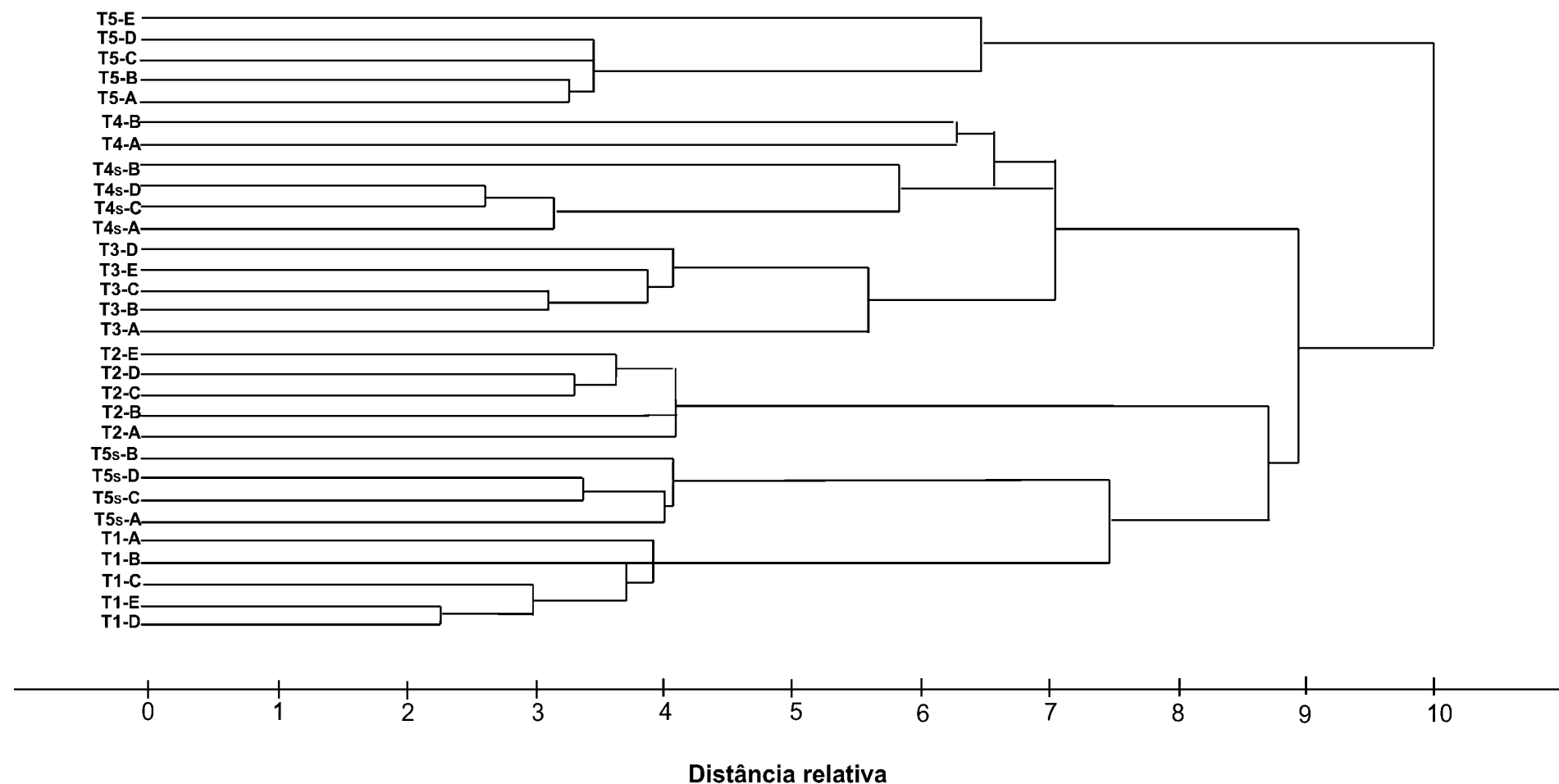
TABELA 8: A COMPOSTOS DERIVATIZADOS DETECTADOS E NÃO IDENTIFICADOS EM EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS EM TESTE DE PODA DE *I.paraguaniensis*.

ID	IR	Fragmentos				Área relativa (%)						
						Tempo de coleta						120 min
						0 min	15 min	30 min	60 min (S)	60 min	120 min (S)	
3	1213,7	144	218	133	-	-	0,15	-	-	-	-	0,00
4	1255,9	116	132	88	0,01	-	-	-	-	-	0,01	0,04
8	1361,0	204	188	218	-	-	0,03	0,07	-	-	-	0,02
12	1526,9	304	216	174	-	-	-	-	-	-	-	0,05
17	1737,6	147	217	394	0,02	0,01	-	-	-	-	0,01	0,03
19	1818,1	273	347	375	0,03	0,42	-	0,04	-	-	0,19	0,16
27	1901,9	174	338	130	0,22	0,18	0,18	0,28	0,15	-	0,18	0,65
29	1909,1	204	319	217	0,02	0,01	0,14	0,03	0,05	-	0,08	0,39
30	2049,7	331	313	117	0,03	0,06	0,02	0,06	-	-	0,02	0,03
32	2103,0	319	147	205	0,02	0,03	0,01	-	-	-	0,03	0,02
33	2125,4	147	217	319	-	-	-	-	-	-	-	0,02
34	2130,4	147	217	319	0,02	-	-	-	-	-	-	0,04
36	2189,4	204	147	191	-	0,01	-	-	-	-	-	-
37	2314,4	204	147	328	-	-	-	-	-	-	-	0,01
38	2508,6	204	321	361	-	0,01	-	-	-	-	0,03	-
39	2548,1	204	740	361	0,07	0,03	-	-	-	-	0,12	0,02
41	2772,9	191	204	433	0,08	-	0,90	1,16	-	-	-	0,99
42	2776,0	361	204	217	0,03	0,01	0,00	0,00	0,31	-	0,60	0,04
43	2858,4	361	204	217	-	-	-	-	-	-	-	0,03
44	2965,1	204	217	433	0,22	0,06	0,49	0,14	-	-	0,20	0,55
45	2983,2	345	255	219	0,03	0,01	0,00	0,00	-	-	0,02	-
46	2984,0	345	255	219	0,02	-	-	-	-	-	-	-
49	3136,8	133	119	207	0,03	0,05	0,02	0,06	0,02	-	0,03	0,06
52	3166,3	307	255	489	0,27	0,12	-	-	-	-	0,13	-
53	3169,2	345	249	447	0,07	0,04	-	-	-	-	0,05	-
55	3339,5	361	437	217	1,55	0,38	0,22	0,51	2,17	-	1,41	0,43

NOTA: (S) Poda em sequência. A aplicação de teste t (ANOVA), não encontrou diferença significativa para nenhum dos compostos relacionados.

Com o uso da ferramenta analítica HCA foi possível verificar as semelhanças matemáticas existentes, utilizando a distância Euclidiana entre as amostras e os metabólitos encontrados nos distintos tempos da coleta no teste de poda (Figura 19).

FIGURA 19: ANÁLISE HIERÁRQUICA DAS AMOSTRAS (HCA) DO TESTE DE PODA, OBTIDA ATRAVÉS DA DISTÂNCIA EUCLIDIANA MÉDIA



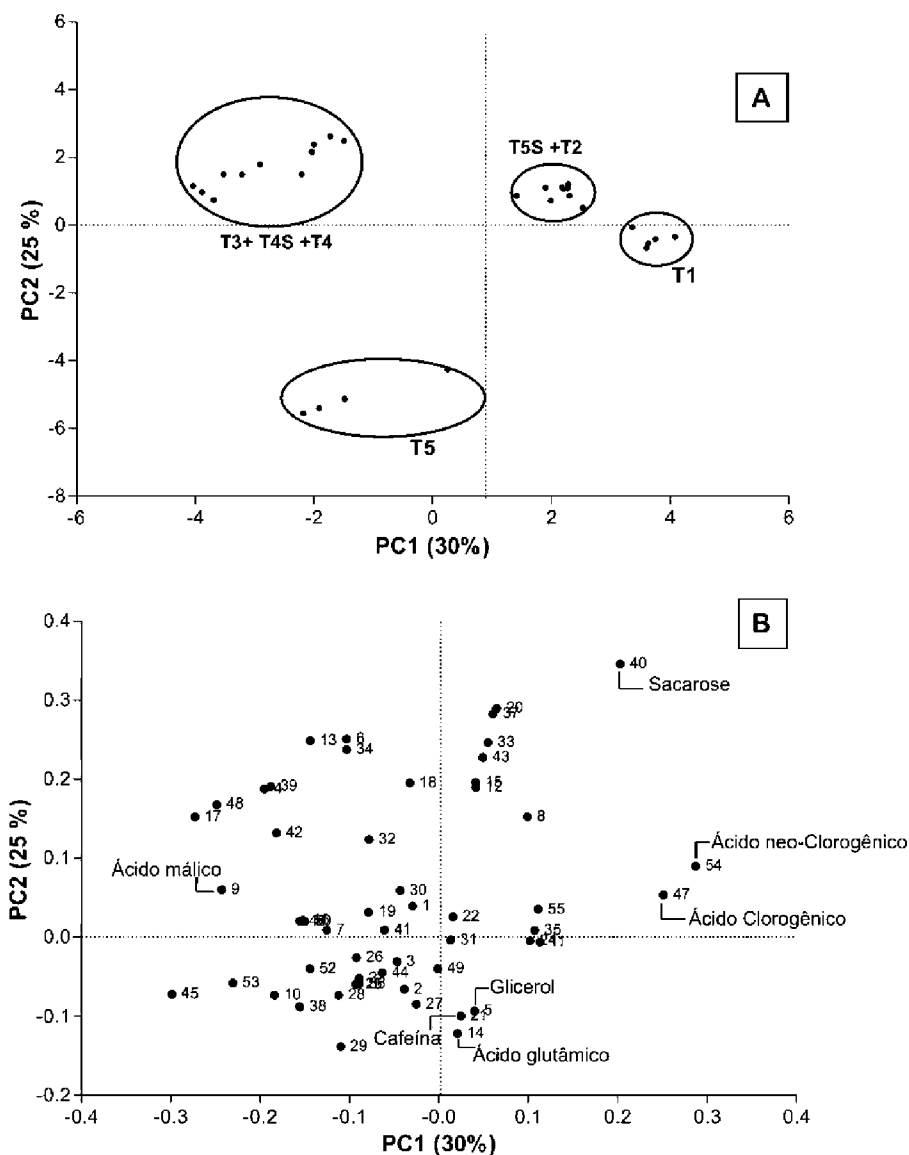
NOTA: T1- amostras coletada no tempo inicial 0 min; T2-Amostras coletadas no tempo de 15 min; T3-amstras coletadas no tempo de 30 min; T4s-amstras coletadas sequencialmente no tempo de 60min; T4-amstras coletadas no tempo de 60min; T5s-amstras coletadas sequencialmente no tempo de 120min; T5-amstras coletadas no tempo de 120min.

Na análise de HCA, ao se considerar uma distância relativa de 9 , vê-se a separação de três grupos distintos: i) T1, T2 e T5s; ii) T3, T4 e T4s; iii) T5 (Figura 19). O tempo de coleta T5 (120 min) é o que mais se distancia dos demais, assim sugere-se que durante esse tempo o processo de defesa está ativo e a alteração nos níveis de metabólitos é percebida com mais ênfase, indicando que a resposta a um dano ao longo do tempo é mais importante que a resposta acumulativa causada por ferimentos consecutivos ao tecido vegetal. Para confirmar se o padrão de separação das amostras se mantinha e para verificar quais compostos ajudavam na separação de grupos foi aplicado a PCA .

No caso da PCA, a contribuição de cada metabólito a um componente específico é refletido pelo valor de carga em um PC (Figura 20A). Esses metabólitos com maiores valores de carga são indicados como tendo a mais forte influência sobre as respectivas características de um grupo (Figura 20B). Assim, os dados apresentados na HCA (Figura 19) são corroborados pela PCA (Figura 20A), onde o mesmo padrão de separação das amostras é observado, com proximidade de T1, T2 e T5s e o conjunto formado entre T3, T4s e T4.

A PCA é útil para identificar o fator-chave do metaboloma (TOHGE *et al.*, 2005), uma vez que separa os compostos que mais contribuem para um determinado conjunto de amostras. Os dois primeiros componentes principais explicam 55% do sistema, sendo que entre os metabólitos presentes os compostos glicerol (5); ácido glutâmico (14) e cafeína (21), mais influenciam na separação das amostras coletadas em T5, uma vez que, estes são compostos que possuem maior concentração nessas amostras (Tabela 7, pág 77). Já os compostos ácido clorogênico (47) e ácido neo-clorogênico (54) são mais abundantes nas amostras coletadas em T1 (Tabela 7), auxiliando na separação destas amostras das demais em PC1 negativo (Figura 20A). O composto sacarose (40), em menor concentração em T5 (Tabela 7) influencia a separação das amostras de T1, T2 e T5S, enquanto o composto 9 (ácido málico) é um dos compostos que influenciam a separação de T3, T4 e T4s já que não foi detectado nesse grupo de amostras (Figura 20B, Tabela 7).

FIGURA 20: (A) SCORES DO CONJUNTO DE COMPOSTOS NOS EXTRATOS DE FOLHAS ADULTAS DE *I. PARAGUARIENSIS* COLETADA NOS DISTINTOS TEMPOS (T1) 0 MIN; (T2) 15 MIN; (T3) 30 MIN; (T4S) 60 MIN SEQUENCIALMENTE; (T4) 60 MIN; (T5S) 120 MIN SEQUENCIALMENTE E (T5) 120 MIN. (B) LOADINGS DOS DADOS PARA OS DISTINTOS TEMPOS DE COLETA. A IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PODE SER VISUALIZADA NAS TABELA 7 E 8.



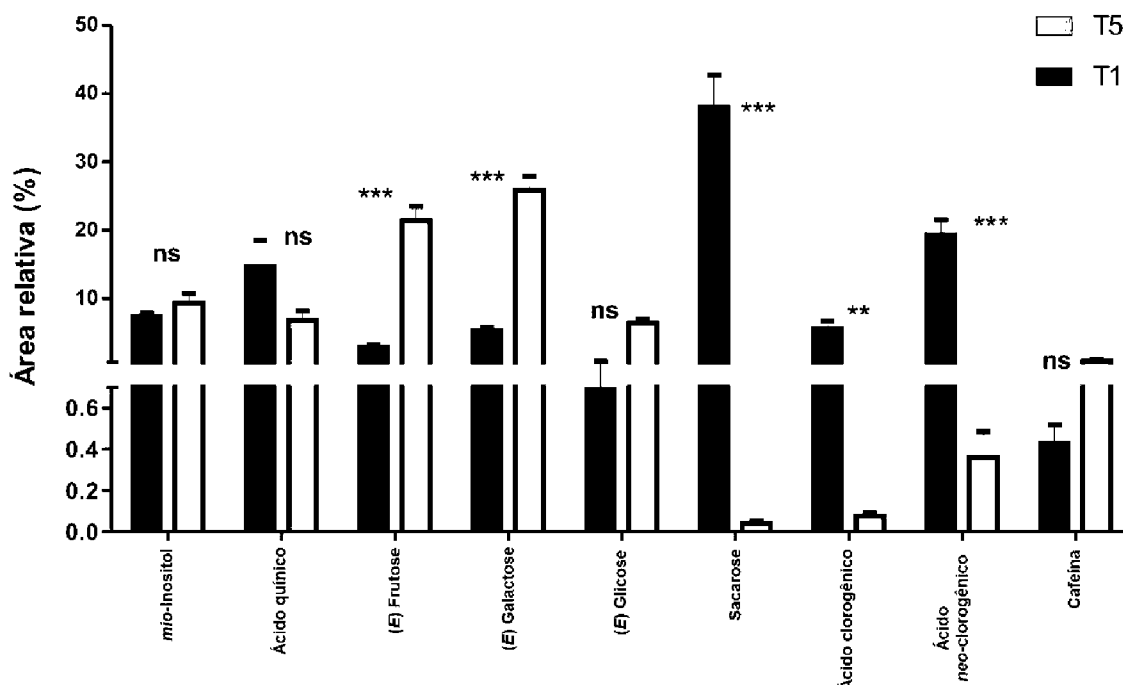
Fonte: O autor (2018).

Na Tabela 7 é demonstrado que apenas os compostos ácido quínico (22), frutose (22-23), glicose (28), ácido clorogênico (47, ácido 3-cafeiolquínico) e neo-clorogênico (54, ácido 5-cafeiolquínico), apresentaram diferenças estatísticas nos distintos tempos de coleta. Em T1 (0 min), esses compostos representaram cerca de 72% de porcentagem relativa. A expressividade destes compostos é alterada ao longo do tempo após poda, embora similaridades na distribuição de metabólitos seja percebida entre T1, T2, T4 e T5s (Figura 19). Os tempos de

coleta T3 e T4s apresentaram distribuição de metabólitos semelhantes, com exceção dos compostos sacarose e glicose, que são . Em T5 é observada a maior distribuição de porcentagem relativa para os açúcares redutores frutose e galactose, que representam sozinhos 69% da porcentagem relativa (Tabela 7). Os fatos apresentados sugerem que o tempo de resposta na mudança do perfil metabólico ocasionado por um estresse (*i.e.* dano em tecido vegetal) favorecem que compostos fenólicos e sacarose sejam consumidos durante o processo (Tabela 7, Figura 20).

Na separação da Figura 20B a sacarose é um dos compostos que influência a distinção entre os tempos T1 e T5, já que sua concentração é maior em T1. Na análise de variância somente os açúcares sacarose (40), frutose (25) e galactose (26), e os ácidos fenólicos ácido clorogênico (47) e neo-clorogênico (54) foram significativamente diferentes (Figura 21).

FIGURA 21: HISTOGRAMA COMPARATIVO DOS COMPOSTOS RELEVANTES EM EXTRATO DE TECIDO FOLIAR ADULTO DE *I. paraguriensis* EM PODA REALIZADA NOS TEMPOS T1 (0 MIN) E T5 (120 MIN). NA QUAL: ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$ E NS, $P > 0,05$. COMO NOS AÇÚCARES REDUTORES OCORRE ISOMERIA GEOMÉTRICA OCASIONADA PELA OXIMAÇÃO, OPTOU-SE PARA TRATAMENTO DOS DADOS A ESCOLHA DE APENAS O ISÔMERO E.



Fonte: O autor (2018).

A alteração nos teores dos compostos é mais proeminente ao longo do tempo após 120 min ao dano (T5), sendo os teores dos açúcares redutores (frutose, galactose e glicose), sacarose e os antioxidantes ácidos clorogênico e

neo-clorogênico os mais influenciados (Tabela 7, pág. 77). A alteração e consumo desses compostos estão correlacionados com as alterações químicas ocasionadas frente a uma condição de estresse, onde as plantas defendem-se, mudando entre outros aspectos a produção e emissão de compostos orgânicos (CORRÊA, 2007; AOYAMA; LABINAS, 2012; WAR *et al.*, 2012). Segundo Schubert e colaboradores (2006) um dos fatores que podem afetar o teor destes metabólitos nos tecidos é o tipo de poda e intervalo entre elas. A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de uma cascata de eventos e sinais que se inicia no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo. Sendo que o impacto do estresse causado na performance da planta depende da sua fenologia (estágio de desenvolvimento), do local afetado, da intensidade e frequência do dano causado (BEGON *et al.*, 1996; CRAWLEY, 1997; BOEGE; MARQUIS, 2005).

Os ácidos clorogênicos são alguns dos ácidos fenólicos mais relatados em erva mate (ISOLABELLA *et al.*, 2010; MURAKAMI *et al.*, 2011; BAE *et al.*, 2015). Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico, sendo esta última menos significativa em plantas superiores. Assim, a rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, sendo este o principal aminoácido do qual deriva os compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Então, esses ácidos fenólicos são produzidos e consumidos após dano em tecido saudável, para produção de antioxidantes e proteção dos tecidos, como uma resposta de defesa (CORRÊA, 2007; AOYAMA; LABINAS, 2012; WAR *et al.*, 2012).

A sacarose é o açúcar não redutor mais abundantemente encontrado em tecidos vegetais, e este é hidrolisado à açúcares redutores (frutose e glicose) em um processo natural, que pode ser acelerado em situação de estresse (SHULAEV *et al.*, 2008). Açúcares redutores, de modo geral, são responsáveis pela estrutura e proteção da planta (DAVIS, LOESCHER, 1991; MAGEL, EINIG, HAMPP, 2000; ROESSNER *et al.*, 2001). A hidrólise da sacarose para formação de açúcares não redutores é observada, no qual se levanta a hipótese de que esta é requerida para formar açúcares menores que suportem a produção de compostos de

proteção, uma vez que a base para qualquer processo metabólico de proteção (formação de metabólitos secundários) está suportada na glicólise (TAIZ; ZEIGER, 2013; SHULAEV *et al.*, 2008).

A diferença estatística para os teores de mio-inositol (Tabela 7, pág. 77) ao longo do tempo, ou seja, tempos intermediários (T1/T2/T4), foi interessante, já que é comumente relatado como hidrato de açúcar ligado diretamente à manutenção do potencial osmótico, contribuindo para tolerância ao estresse hídrico (WILLADINO; CAMARA, 2010), ou seja, frente ao estresse, há a sinalização para produção de compostos inespecíficos de proteção de tecidos.

As Figuras 19 e 20 demonstram que a resposta ao dano (relação T1xT5) causada pela poda levou ao consumo dos ácidos fenólicos e de sacarose, e alteração significativa nas concentrações dos açúcares redutores frutose e galactose (Figura 21). Assim, os ácidos clorogênico e neo-clorogênico podem estar sendo consumidos nos processos antioxidantes para proteção do tecido lesionado (CORRÊA, 2007; AOYAMA; LABINAS, 2012; WAR *et al.*, 2012), ou ainda devido ao direcionamento na biossíntese para a produção de flavonoides, o qual interrompe/diminui a síntese desse ácidos clorogênicos, visando a uma proteção ao dano, como visto em ataques causados por insetos (WAR *et al.*, 2012).

A alteração nos teores de carboidratos corrobora com a hipótese levantada anteriormente, de que a sacarose está sendo hidrolisada a açúcares (e.g. frutose) para que estes sejam utilizados durante a glicólise na produção desses compostos de proteção (TAIZ; ZEIGER, 2013).

5 CONCLUSÕES

A confecção de biblioteca de dados no AMDIS foi satisfatória e permitiu o uso e a identificação dos compostos em diferentes matrizes e tecidos.

A detecção de flavonoides e ácidos cafeiolquínicos e seus derivados na mesma metodologia já utilizada para obtenção dos metabólitos polares se mostrou possível, já que os resultados demonstram que os compostos testados estão em grande parte ou em sua totalidade na mesma fração dos demais metabólitos polares. O planejamento experimental realizado demonstrou que a melhor condição cromatográfica, para análise de perfil metabólico, envolve a menor temperatura do injetor (230 °C) e a maior temperatura de isoterma final (320 °C).

Os dados obtidos das análises cromatográficas empregando os padrões demonstraram que a técnica empregada é menos sensível para aminoácidos e compostos nitrogenados.

O tratamento dos dados gerados através do uso de ferramentas de análise multivariadas (HCA e PCA), amparadas por teste estatístico, demonstraram que para o teste de danos à resposta à uma lesão ao longo do tempo é mais importante que a resposta acumulativa causada por dados consecutivos ao tecido vegetal, e que o tempo mínimo necessário para que alterações mais relevantes ocorram é de 120 min. Assim experimentos que necessitem de coletas ao longo do tempo devem usar mudas distintas para que o efeito de estresse não afete os resultados.

Os compostos que mais sofreram alterações significativas frente à situação de estresse foram sacarose, frutose, galactose, ácido clorogênico e neo-clorogênico. Os ácidos clorogênicos são alguns dos ácidos fenólicos mais relatados em erva mate e são produzidos e consumidos após lesão em tecido saudável, para produção de antioxidantes, tais como flavonoides, como uma resposta de defesa.

A observação do consumo de sacarose e aumento dos teores de frutose e galactose entre T1 e T5, infere que a sacarose está sendo hidrolisada à glicólise para produção de subprodutos, que ao entrarem no ciclo do ácido cítrico levarão à formação de diversos compostos, inclusive antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ALLWOOD, J. W.; ERBAN, A.; KONING, S.; DUNN, W. B.; LUEDEMANN, A.; LOMMEN, A.; KAY, L.; LÖSCHER, R.; KOPKA, J.; GOODACRE, R. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. **Metabolomics**, v.5, p.479-496, 2009.
- AOYAMA, E. M.; LABINAS, A. M. Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia. n.8, p.365-386, 2012.
- BAE, K.; HAM, H. M.; JEONG, M. H.; KIM, D. H.; KIM, H. J. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, 2015.
- BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª ed, Campinas: Unicamp, 299 p., 1996.
- BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 26, p. 77-89, 2003.
- BEGON, M.; MORTIMER, M.; THOMPSON, D. J. **Population Ecology**: a unified study of animals and plants. 3ed. Oxford: Blackwell, 1996
- BEHRENDTS, V.; TREDWELL, G. D.; BUNDY, J.G. A software complement to AMDIS for processing GC-MS metabolomic data. **Analytical biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 206-208, 2011.
- BOEGE, K.; MARQUIS, R. J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, pp. 441-448, 2005.
- CORRÊA, P. G. **Defesas Foliares em Resposta à Herbivoria em Espécies Lenhosas, Ipojuca-PE**. (Master's Degree). Universidade Federal Rural do Pernambuco. 2007.
- CRAWLEY, M. J. Plant-Herbivores Dynamics. In: CRAWLEY, M. J. (ed.). **Plant Ecology**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, p.401-474, 1997.
- DAVIS, J. M. LOESCHER, W. H. Diurnal Pattern of Carbohydrates in Celery Leaves of Various Ages. **Hort Science**. n.26, v.11, p.1404-1406, 1991.
- DETHLOFF, F. ERBAN, A., ORF, I., ALPERS, J., FEHRLE, I., BEINE-GOLOVCHUK, O., ... & KOPKA, J. Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry. In: **Plant Cold Acclimation**. Humana Press, New York, NY, p.171-197, 2014.

DU, X.; ZEISEL, S. H. Spectral deconvolution for gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics: current status and future perspectives. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 4, n. 5, p. 1-10, 2013.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n.15, p.3573-3580, 2000.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155-171, 2002.

FILIP, R.; LOTITO, SB.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 51, p.116-134, 2007.

GOUVÊA, M. M. LIMA, G. S., NETO, A. A. S., NETTO, A. D. P., & MARQUES, F. F. D. C. Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para pré-tratamento de amostras. **Quimica Nova**, v. 37, n. 2, p. 337-343, 2014.

GULLBERG, J. A.; PÄR, J. B.; NORDSTRÖM, A. A.; SJÖSTRÖM, M. B.; MORITZA, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.331, p. 283-295, 2004.

HALKET, J. M. WATERMAN, D., PRZYBOROWSKA, A. M., PATEL, R. K., FRASER, P. D., & BRAMLEY, P. M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 410, p. 219-243, 2004.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138 – 151, 2007.

HUMMEL, J., STREHMEL, N., SELBIG, J., WALTHER, D., KOPKA, J. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. **Metabolomics**, v. 6, n. 2, p. 322-333, 2010.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R.; Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JEONG, L. M.; JIANG, H.; CHEN, H. S., TSAI, C.J.; HARDING, S. A. Metabolic profiling of the sink-to-source transition in developing leaves of quaking aspen. **Plant Physiology**, v.136, p.3364-3375, 2004.

KIND, T., WOHLGEMUTH, G., LEE, D. Y., LU, Y., PALAZOGLU, M., SHAHBAZ, S., FIEHN, O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038-10048, 2009.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v.124, p.312-322, 2006.

LAINE, R. A.; SWEELEY C. C.. Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**. v 43. p.533-538, 1971.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG,K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24., n.5, p.732-737, 2008.

MAGEL ,E.; EINIG W.; HAMPP, R. Carbohydrates in trees. **Developments in Crop Science**. v 26, p. 317–336, 2000.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

MASTRANGELO, A., FERRARINI, A., REY-STOLLE, F., GARCÍA, A., BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: a tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica chimica acta**, v. 900, p. 21-35, 2015.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B.R.T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry.**Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 271–278, 2007.

MEYER, R. C.; STEINFATH, M., LISEC, J.; BECHER, M.; WITUCKA-WALL, H.; TÖRJÉK, O. ... & ALTMANN, T. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4759-4764, 2007.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **Food Science and technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523-1542, 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J.L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas. **Circular Técnica**, 43, 60 p., 2000.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**. v.13, p.11–29, 2001.

RUIZ-MATUTE, A. I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, S.; SANZ, M. L.; MARTINEZ-CASTRO, I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 1226–1240, 2011.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURGB, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBESE, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC–MS Libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **Phytochemical Letters**, v.579, pp.1332-1337, 2005.

SCHAUER, N.; FERNIE, R. A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v.11, n.10, pp. 508-516, 2006.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (erva mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SHULAEV, Vladimir *et al.* Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 199-208, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed, Aguiar, P. F.; Alencastro R. B. (tradutores), LTC: Rio de Janeiro, 2000.

STEIN, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 8, p. 770-781, 1999.

STREHMEL, N.; HUMMEL, J.; ERBAN, A.; STRASSBURG, K.; KOPKA, J. Retention Index Thresholds for Compound Matching in GC-MS Metabolite Profiling. **Journal of Chromatography**. v. 871, p.182-190, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TOHGE, T.; NISHIYAMA, Y.; HIRAI, M. Y.; YANO, M.; NAKAJIMA, J.; AWAZUHARA, M.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; GOODENOWE, D. B.; KITAYAMA, M.; NOJI, M.;

YAMAZAKI¹, M.; SAITO, K. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. **The Plant Journal**, v. 42, p. 218-2235, 2005.

TURGEON, R. The Sink-Source Transition in Leaves. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 119-138, 1989.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p. 463-71, 1963.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX. n. 36, p. 58-69, 2006.

WAGNER, C.; SEFKOW, M.; KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v.62, p. 887-900, 2003.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A., HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306, 2012.

WENDLING, I. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. **Embrapa Florestas. Documentos**, Colombo: Embrapa Florestas, v.91, p.46, 2004.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico. **Embrapa Florestas. Circular técnica**, 2008.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos biológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1563-1578, 2010.

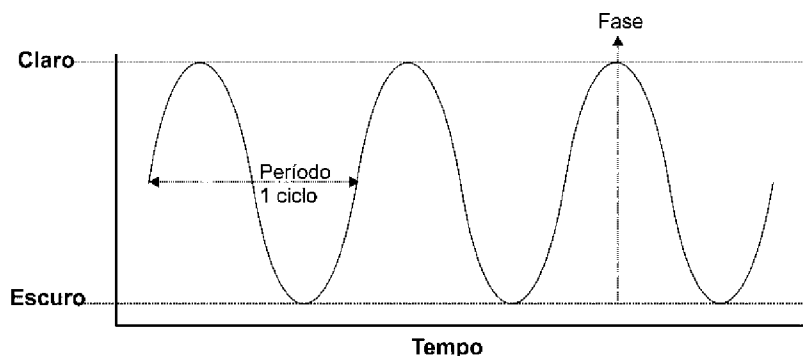
CAPÍTULO 2
INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO E DA SAZONALIDADE NO PERFIL
METABÓLICO DE ERVA-MATE

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hill.) espécie arbórea nativa de países da América do Sul como Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai tem ganhado mercados da Europa, Estados Unidos, Síria e Japão (ISOLABELLA *et al.* 2010) pela presença de compostos fitoquímicos com diversos benefícios à saúde humana (e.g. anti-inflamatória, antiaterogênica, efeitos diuréticos e energéticos (HECK; MEJIA, 2007). Entre os compostos presentes na erva-mate, interessantes à saúde humana estão a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (ASHIHAR; SANO; CROZIER, 2008); e os compostos fenólicos, dos quais o ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) e seus isômeros (ácido cripto-clorogênico (ácido 4-cafeoilquínico) e ácido neo-clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) ganham destaque (FILIP *et al.* 2001). Para a indústria de beneficiamento de erva-mate (e.g. alimentícia e farmacêutica), é vantajoso que os produtos à base da planta contenham elevadas quantidades desses ácidos fenólicos, responsáveis pelas propriedades antioxidantes, e de cafeína como composto estimulante (BASTOS *et al.*, 2006).

A produção e consumo destes compostos bioativos, e outros metabólitos, têm sua bioquímica alterada naturalmente para manutenção de atividades biológicas basais ao crescimento e funcionamento da planta e como resposta a alterações ambientais sutis (luminosidade, sazonalidade) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; DALMAGRO *et al.*, 2018), isso porque, o metabolismo e a fisiologia de todos os organismos são processos naturais, gerados endogenamente e autossustentáveis, ou seja, mantém-se ritmados (KIELBOWICZ-MATUK; CZARNECKA, 2014). As plantas desenvolveram estratégias para garantir maior adaptabilidade frente a agentes estressores (*i.e.* micro-organismos, luz, calor), entre os quais se destacam os processos ritmos que ocorrem no período de um dia, os chamados ritmos ou ciclos circadianos, prevendo as alterações da luminosidade (período de claro e escuro) que ocorrem durante um determinado intervalo, que não necessariamente dura o tempo de rotação da Terra Figura 22 (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004; MCCLUNG, 2006), já que são intrínsecos (endógenos) aos organismos e não impulsionado por alterações geofísicas (WIJNEN; YONG, 2006).

FIGURA 22: REPRESENTAÇÃO DE UM CICLO CIRCADIANO. EM QUE: PERÍODO É A DURAÇÃO DE TEMPO NECESSÁRIO PARA COMPLETAR UM CICLO. FASE É UM EVENTO ESPECÍFICO, COMO O AMANHECER (INÍCIO DE ESTÍMULOS LUMINOSOS)



FONTE: Adaptado de McClung (2006).

Os primeiros estudos sobre os ritmos biológicos circadianos datam do século IV AC durante as marchas de Alexandre, o Grande, pela Pérsia, com a descrição dos movimentos cotidianos de *Tamarindus indicus* (tamarindeira), por Androstenes. Apenas após dois milênios, em 1729, um astrônomo francês, Mairan, sugeriu a origem endógena de ritmos, através da descrição da dinâmica diária das folhas de *Mimosa pudica*, sensível a longos períodos de escuro (MCCLUNG, 2006). No mesmo período Carl Von Linne construiu o chamado “relógio das flores”, ao descrever as mudanças na abertura das pétulas de diferentes espécies florais ao longo do tempo (KUHLMAN; MARCKEY; DUFFY, 2007). Os experimentos de Mairan foram reproduzidos em 1757, e em outros estudos posteriores, que relataram a regulação circadiana como sendo controlada por geradores de tempo (*‘zeitgebers’* em alemão), ou seja, genes ativados quando na presença de fatores externos cíclicos e periódicos, tais como a temperatura e a luz, que conduzem, entre outros, os ritmos de movimento foliar (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004). Atualmente com o avanço da engenharia genômica já é sabido que esses *zeitgebers* nada mais são que genes e proteínas que controlam os estímulos luminosos nas plantas, dentre os quais se destaca o gene *TOC1*, primeiro gene descoberto como regulador central de ciclos circadianos em períodos de escuro (STRAYER *et al.*, 2000; GRAF *et al.*, 2009).

Os ciclos circadianos possuem sistemas de compensação de temperatura que funcionam impedindo que mudanças metabólicas causadas por pequenas variações da temperatura não promovam grandes alterações no relógio biológico, isso só é possível pela hereditariedade dos ritmos circadianos, proposta por Darwin e, comprovada com o advento das análises genéticas na década de 70 (MCCLUNG,

2006). Caso contrário como a maioria dos processos químicos, que são dependentes da temperatura (i.e. acréscimos de temperatura aumentam a atividade cinética de reações), os relógios circadianos seriam extremamente sensíveis e teriam ciclos muito menores e dependentes da variação da temperatura (JOHNSON, 2005; KUHLMAN; MACKEY; DUFFY, 2007). Isso, obviamente pode ser influenciado pela sazonalidade, que representam variações na temperatura e luminosidade (e.g. dias mais longos no verão) em um longo período de tempo e não pequenas mudanças ao longo de um dia. Por exemplo, a regulação diurna do metabolismo primário (i.e. a regulação de açúcares) relacionado ao crescimento em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrada em dias curtos, com menor quantidade de luz (SMITH; STITT, 2007), típicos de inverno. Entretanto, o maior crescimento é relacionado com períodos de dias longos, já que apresentam maior taxa fotossintética (FUKUSHIMA *et al.*, 2009; GRAF *et al.*, 2010).

Diversos processos metabólicos são controlados pelos relógios circadianos, tais como crescimento (TUTTY *et al.*, 1994), competição por luz (LOCKE *et al.*, 2006) e defesa (GOODSPEED *et al.*, 2012), processos fotossintéticos de homeostase redox e assimilação de nutrientes também ganham destaque (NOZUE *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; MAIBAM *et al.*, 2013).

Os componentes genéticos dos relógios, genes constitutivos, são controlados por ritmos metabólicos, que por sua vez são produzidos pelas enzimas transcritas (HOTTA *et al.*, 2007; FUKUSHIMA *et al.*, 2009). A grande maioria dos estudos, sobre o tema, busca o entendimento do funcionamento de ciclos circadianos através de análises de proteômica e transcriptômica em planta modelo, *A. thaliana* (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004; MCCLUNG, 2006), sendo que, apenas recentemente, ocorreu a expansão da análise de perfil metabólico relacionada com o entendimento do ritmo circadiano (FUKUSHIMA *et al.*, 2009; ESPINOZA *et al.*, 2010). Até o momento, pouco se sabe sobre a ação do mecanismo do relógio circadiano para outras espécies de plantas, sendo que estes estudos se restringem às espécies importantes para a agricultura tais como arroz, milho e soja (KIELBOWICZ-MATUK; CZARNECKA, 2014).

Da mesma forma que a regulação cíclica diária, como resposta à mudança de luminosidade, é uma abordagem adaptativa usada pelas plantas. Outros ajustes metabólicos, estruturais e fenodinâmicos são desenvolvidos pelo reino vegetal para lidar com as adversidades ambientais, como modificações hídricas e de temperatura

causados pela sazonalidade (DALMAGRO *et al.*, 2018). Entre as abordagens utilizadas pelos vegetais estão as modificações na produção de metabólitos primários (e.g. regulação nas produções de aminoácidos, GIBON *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2006; GRAF *et al.*, 2010) e do metabolismo secundário (e.g. mudanças nas rotas metabólicas de produção de polifenóis) (KIELBOWICZ-MATUK; CZARNECKA, 2014). Estudos demonstraram que o uso da análise metabolômica possibilitou a detecção de oscilações circadianas em 30% dos metabólitos medidos em experimentos com *A. thaliana*, principalmente metabolitos envolvidos na biossíntese de arilpropanoides (ligados à produção de compostos fenólicos) e do metabolismo de açúcar (ESPINOZA *et al.*, 2010). Entretanto, poucos estudos envolvem espécies arbóreas, tal como a erva-mate, ou seja, existe pouco conhecimento sobre a influência das variações sazonais (SOMMAVILLA *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2017; TÁLOS-NEBEHAJ; HOFMANN; ALBERT, 2017) e circadianas (ESPINOZA *et al.*, 2010; KARAPETYAN; DONG, 2018) no conteúdo fenotípico destes compostos. Além disso, menor ainda são os estudos que abordam técnicas de perfil metabólico (LÓPEZ-ORENES *et al.*, 2018), sendo essas interessantes para o estudo que apontam mudanças a nível molecular nos metabólitos primários, os quais são a base para a síntese de bioativos, como os compostos fenólicos (*i.e.* ácidos clorogênicos) abundantes em *Ilex paraguariensis* (HECKE; MEJIA, 2007).

1.1 VARIÇÃO FENOTÍPICA

O cultivo da erva-mate é baseado em sistemas clonais, em que uma planta matriz é replicada (clonada) em plantas filhas (CARVALHO, 2003), e embora essas sejam genomicamente idênticas (mesmo DNA), e pertencentes à mesma espécie (*I. paraguariensis*) a plasticidade fenotípica pode fazer com esses clones expressem seus fenótipos distintamente quando em ambientes diferentes (e.g. diferente luminosidade e temperatura) (STURION; RESENDE, 2005). O conceito de plasticidade fenotípica está relacionado com a capacidade de um organismo vivo possuidor de um determinado genótipo exibir diferentes fenótipos, em função das condições ambientais (FUTUYMA, 1998). Tais mudanças podem ser classificadas em quatro categorias principais e podem ocorrer em conjunto ou separadamente: i) morfológicos, que são as variações estruturais nos tecidos (e.g. modificação na forma e tamanho de folhas); ii) fisiológicos, relacionadas às transformações das

funções mecânicas, físicas e bioquímicas (e.g. produção de compostos para proteção frente a condição de estresse); iii) comportamentais, alteração na dinâmica natural do crescimento e morfologia da planta (e.g. germinação de flores no inverno) e iv) fenológicos, variação relacionadas com a periodicidade endógena dos organismos, tais como os relacionados com a sazonalidade e luminosidade (ciclo circadiano) (LIMA *et al.*, 2017).

Como a expressão fenotípica é muitas vezes sobreposta ao genótipo em uma mesma espécie, os clones de erva-mate podem ser classificados com relação a diferenças fenotípicas, sendo a morfologia de suas folhas e a concentração de compostos as classificações mais rotineiras (TECHIO *et al.*, 2009). Dessa forma, a expressão gênica pode ser transformada em decorrência de ritmos circadianos, e de condições ambientais específicas. Assim, o estudo dos produtos gênicos, tais como os metabólitos, pode ajudar a elucidar os motivos dessas diferenças e auxiliar no aperfeiçoamento de técnicas de melhoramento genético visando uma maior produção de compostos bioativos na erva mate.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do ciclo diurno-noturno e da sazonalidade no perfil de metabólitos em tecido foliar de erva-mate.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍCOS

- Analisar em clones com contrastantes concentrações de cafeína se mudanças da luminosidade alteram o metabolismo na formação e transporte de compostos específicos da erva-mate;
- Verificar se existe influência sazonal no perfil de metabólitos;
- Relacionar as informações obtidas com as vias metabólicas envolvidas na formação de compostos de interesse comercial (*i.e.* cafeína, ácidos clorogênicos) e se estas apresentam alterações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes e padrões utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha), com grau de pureza de 97-99 % e grau CLAE para os solventes Metanol e Clorofórmio (Merck, BR). Todos os compostos utilizados são listados na Tabela 9.

TABELA 9: PADRÕES E REAGENTES UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES.

COMPOSTO	CAS	FUNÇÃO
Metanol		Solvente (agente extrator)
Clorofórmio		Solvente (agente extrator)
Piridina	CAS 110-86-1	Solvente
4-Dimetilamino-piridina	CAS 110-86-1	Catalisador
¹³ C ₆ -Sorbitol	CAS 121067-66-1	Padrão interno (fase polar)
Ácido nonadecanóico	CAS 1731-94-8	*Padrão interno (fase apolar)
Cloridrato de Metoxiamina	CAS 593-56-6	Derivatizante
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA)	CAS 25561-30-2	Derivatizante
<i>n</i> -decano	CAS 124-18-5	Padrões de alcanos para cálculo de índice de retenção
<i>n</i> -dodecano	CAS 11240-3	
<i>n</i> -pentadecano	CAS 629-62-9	
<i>n</i> -octadecano	CAS 593-45-3	
<i>n</i> -nonadecano	CAS 629-92-5	
<i>n</i> -docosano	CAS 629-97-0	
<i>n</i> -octacosano	CAS 630-02-4	
<i>n</i> -dotriacontano	CAS 544-85-4	
<i>n</i> -hexatriacontano.	CAS 630-06-8	

* Ácido nonadecanóico é usado para verificar se a extração líquido/líquido é eficiente.

3.2 MATERIAL VEGETAL E EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados na EMBRAPA Florestas localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil, utilizando dois clones comerciais (AC1 e BC1), com concentrações contrastantes de cafeína provenientes de um programa de melhoramento genético da Embrapa (Tabela 10).

TABELA 10: CLONES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Clone	Gênero	Cafeína (%)	Classificação*
AC1	Fêmea	2,09 ± 0,05	Alta
BC1	Fêmea	0,38 ± 0,12	Baixa

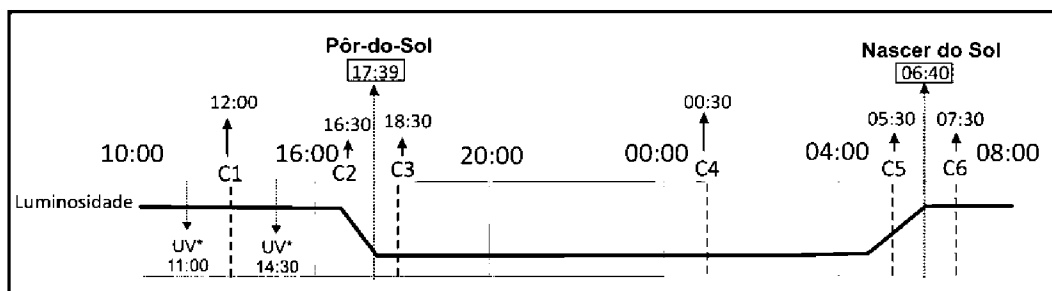
* Classificação segundo dados da Embrapa Florestas.

As plantas utilizadas foram clonadas por método de estaquia e após 2 meses, foram transplantadas e mantidas em um minijardim clonal em sistema semi-hidropônico em canaletão com areia, alocado em casa de vegetação, com podas periódicas de manutenção a cada 3 meses (abril-setembro) e 2 meses (outubro-março).

As mudas foram mantidas sob irrigação por gotejamento, feita com solução nutritiva (WENDLING; DUTRA, 2008) duas vezes por dia na estação de inverno (2,5 L m⁻² / aplicação) por um período de 4 min e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão (1,7 L m⁻² / aplicação) por um período de 3 min e 6 segundos. A coleta do material vegetal (folhas adultas) para a análise dos metabólitos foi realizada após os 16 meses de permanência das mudas no sistema, e ocorria, sempre, na semana que antecedia a poda de manutenção. O experimento do ciclo diurno/noturno foi realizado no mês de maio de 2017, respeitando os estímulos luminosos, com coletas antes e após o nascer e pôr do sol (Figura 23). Segundo o registrado pelo Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná), na data da coleta as temperaturas tiveram poucas flutuações com temperatura máxima de 19° C registrado às 14:00 h e mínima de 13° C às 5:00 h. Dois picos de radiação foram registrados, um às 11:00 h e outro às 14:30 h de 2000 e 1800 W/m², onde a radiação UV também foi máxima para o dia.

O tecido vegetal foi coletado em cinco repetições biológicas de cada clone (4 folhas por repetição), em região mediana da muda e posição intermediária no galho. Em seguida as folhas adultas eram imediatamente imersas em nitrogênio líquido (dentro de até 10 s após o corte). Todos os materiais foram macerados em cadinho com N_{2(l)} e armazenadas a -80 °C até requeridos para extração.

FIGURA 23: REPRESENTAÇÃO EXPERIMENTAL DAS COLETAS. C REPRESENTA AS COLETAS AO LONGO DO TEMPO



FONTE: O autor (2018)

Do mesmo modo, para verificar a produção e consumo de metabólitos com respeito à sazonalidade, folhas adultas foram coletadas nas distintas estações dos anos de 2017 e 2018 na sequência: maio (outono), agosto (inverno), novembro (primavera) e fevereiro (verão), sempre uma hora após o nascer do sol e uma hora antes do pôr do sol (Tabela 11).

TABELA 11: COLETAS REALIZADAS PARA TESTAR A SAZONALIDADE

Dia	Temperatura média	Temperatura máxima	Temperatura mínima	Nascer do Sol	Pôr do Sol	Estação	Tempo
18/05/17	15° C	19° C	13° C	06:40 h	17:39 h	Outono	Nublado
10/08/17	14° C	17° C	12° C	06:34 h	17:47 h	Inverno	Nublado
22/11/17	17° C	13° C	14° C	06:12 h	19:34 h	Primavera	Ensolarado
08/02/18	26° C	29° C	18° C	06:29 h	19:59 h	Verão	Ensolarado

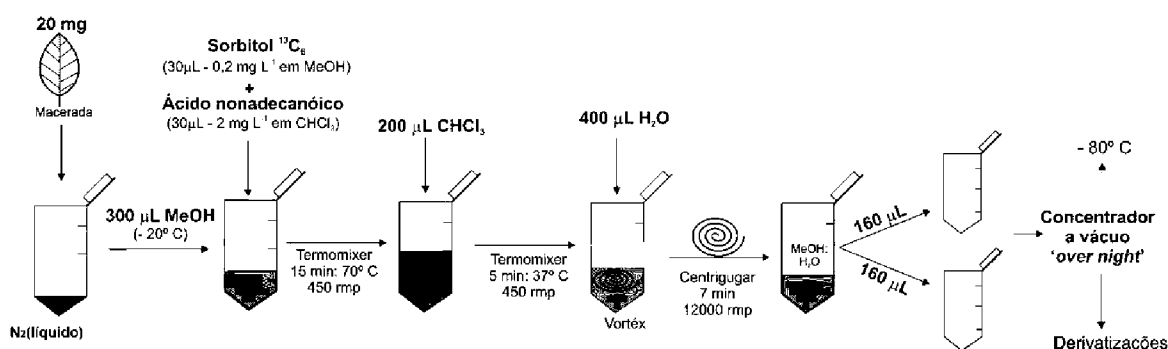
Nota: Dados fornecidos pelo Simepar-PR.

3.3 EXTRAÇÃO

O método de extração foi realizado em fluxo contínuo seguindo o descrito por Dethloff e colaboradores (2014). Brevemente: foram transferidos 20 mg (± 5 mg) do material vegetal anteriormente congelado e triturado, para um tubo Eppendorf de 2 mL. As amostras foram mantidas congeladas em $N_2(l)$ durante a pesagem, para evitar processos de oxidação. Após, foram adicionados com auxílio de micropipeta (Eppendorf) 300 μ L de metanol pré-arrefecido a -20° C. O material vegetal e o solvente, então, foram misturados em vórtex. A este material foi adicionado 30 μ L de $^{13}C_6$ -Sorbitol (padrão interno, 0,2 mg mL⁻¹ em metanol) e 30 μ L padrão de ácido nonadecanóico (controle da extração, 2 mg mL⁻¹ em clorofórmio). Posteriormente, a extração ocorreu em equipamento Thermomixer (Eppendorf), sob agitação constante de 450 rpm por 15 min a 70 °C (após o primeiro minuto de agitação os

eppendorfs eram abertos, afim de retirar o excesso de pressão). Após a incubação as amostras eram resfriadas a temperatura ambiente e, a elas adicionado 200 μL de clorofórmio utilizando-se de seringa de vidro graduada. O conteúdo era misturado em vórtex e em seguida aquecido novamente no Thermomixer a 450 rpm durante 5 min a 37° C. Então, foram adicionados 400 μL de água ultrapura, o conteúdo foi misturado em vórtex por cerca de 20 segundos e centrifugado (Eppendorf *centrifuge* 5417R) durante 7 min a 12000 rpm. Duas alíquotas de 160 μL da fase polar (superior) foram transferidas para dois tubos de eppendorff cônico de 1,5 mL (i.e. uma alíquota para cada tubo), e o extrato era concentrado e seco sob vácuo no 'Speed Vac' (Concentrador plus - Eppendorf, modo V-AQ sem aquecimento) durante a noite, com posterior armazenagem a -80° C até a derivação. O processo de extração utilizado pode ser visualizado na Figura 24.

FIGURA 24: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

3.4 DERIVATIZAÇÕES

A metoximação foi realizada adicionando no extrato seco 40 μL de uma solução preparada em piridina contendo 5 mg mL^{-1} de 4-(dimetilamina)-piridina 40 mg mL^{-1} de cloridrato de metoxiamina, e misturada em vórtex por 30 s. A reação aconteceu em Thermomixer a 950 rpm durante 90 min a 30° C. Após o tempo de incubação, foram adicionados a solução 70 μL do agente de sililação BSTFA, e 10 μL de mistura de alcanos preparada em piridina contendo 0,20 mg mL^{-1} dos padrões de alcanos apresentados na Tabela 9 com exceção de n-decano e n-hexatriacontano preparados em 0,40 mg mL^{-1} , a nova solução – contendo todos os alcanos – foi misturada em vórtex 30 s, e incubados a 37° C em Thermomixer

(Eppendorf) a 950 rpm durante 30 min. Logo após os tubos eppendorfs foram centrifugados a 14000 rpm por 5 min e uma alíquota de 80 μ L transferida para vial com fundo cônico (Thermo, 0,5 mL), e levados para análises cromatográficas.

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O perfil cromatográfico das amostras foi adquirido através de análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa de tempo de voo por ionização por impacto de elétrons (CG-TOF/IE-EM) como especificado por Dethloff e colaboradores (2014), e realizado no Instituto Max Planck (Potsdam-Golm, Alemanha).

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando injeção automática (Agilent, Böblingen, Alemanha) em um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890N) com injetor split e splitless com controle de pressão eletrônico de até 150 psi, acoplado a um espectrômetro de massas de tempo de voo Pegasus III (LECO Instrumento GmbH, Mönchengladbach, Alemanha). As amostras foram injetadas no modo splitless (1 μ L) e no modo split com divisão de fluxo 1:30 (1 μ L), dependendo da concentração dos analitos nas amostras. Os analitos foram separados através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm, Agilent), com a temperatura do injetor à 230 °C e linha de transferência a 250 °C, o gás de arraste usado foi o hélio a fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno foi: 70 °C, isoterma de 1 min, aquecimento até 350 °C na taxa de 9 °C min⁻¹, com isoterma final de 5 min.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 200° C, com resolução de massa nominal com taxa de varredura ajustada para 20 s⁻¹, com intervalo de massas definido para m/z = 70–600.

3.6 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISE

Os cromatogramas gerados pelo software ChromaTOF (Versão 4.22; LECO, St. Joseph, EUA) eram exportados em formato NetCDF para deconvolução e identificação dos compostos usando o software TagFinder sob supervisão manual (LUEDEMANN *et al.*, 2008). Os analitos foram identificados através da comparação

dos espectros de massas e índice de tempo de retenção coletados com a biblioteca de referência do banco de dados metabolômicos, *GDM database* (KOPKA *et al.* 2005, HUMMEL *et al.* 2007; Alemanha). As diretrizes para identificação de metabólitos supervisionados manualmente foram a presença de pelo menos três fragmentos de massa específicos por composto e um desvio do índice de retenção inferior a 1,5% (STREHMEL *et al.*, 2008). As intensidades dos metabólitos (i.e. altura dos picos) foram normalizadas pelo peso das amostras e padrão interno ($^{13}\text{C}_6$ -Sorbitol), usando fragmentos (m/z) característicos de cada composto.

As variáveis foram estatisticamente testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) utilizando o software R com os pacotes *multcomp*, *stats* e *lattice* (R CORE TEAM, 2018)

As variáveis com distribuição de probabilidade normal foram analisadas através da ANOVA com teste F ($p > 0,05$). As variáveis com outras distribuições de probabilidade foram analisadas utilizando o GLM (do inglês 'General Linear Models'- Modelos Lineares Generalizados) com distribuição gama e teste CHISQ ($p < 0,05$). As comparações entre tratamentos e suas interações significativas foram avaliadas por contrastes de Tukey 5%.

Por fim, as variáveis que não se adequaram ao modelo ajustado foram tratadas como não paramétricas, e analisadas com o teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A visualização das semelhanças entre as amostras e as variáveis foram calculadas através da distância euclidiana em análise hierárquica de componentes (HCA) em conjunto com mapas de calor (*HeatMap*) (R Studio Server, pacote *gplots*).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir a dimensão dos dados usando o programa R (Studio Server, pacote *ggfortify*). Os dados foram transformados para CLR ('*centered log ratio*') para os cálculos quimiométricos em que os valores faltantes, compostos não detectados na amostra foram substituídos pelo valor do limite de detecção.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RÍTMO CIRCADIANO NA DISTINÇÃO FENOTÍPICA DE ERVA-MATE

A relação dos metabólitos obtidos por métodos espectroscópicos, como os utilizados para obtenção de um perfil metabólico, pode ser qualitativa ou semi-quantitativa. A primeira verifica apenas a presença ou ausência dos compostos de interesse. A segunda pode ser subdividida entre (i) aquela que utiliza a soma da área relativa de todos os metabólitos, distribuindo-os para que a soma total das áreas seja 100 %, e (ii) quando da adição de um padrão interno, é feita a relação entre a área do composto de interesse e o padrão, assumindo que todos os compostos tenham fatores de respostas iguais (HOFFMAN *et al.*, 2010; DESBROSSES; KOPKA; UDVAR, 2005). No presente trabalho a quantificação foi feita em relação ao padrão interno e a quantidade de massa foliar pesada. A identificação dos constituintes ocorreu mediante análise dos espectros de massas, determinação do índice de retenção (IR) e comparação destes com a biblioteca GDM-Database (DETHOLOFF *et al.*, 2014), o que possibilitou uma identificação segura dos metabólitos polares presentes nos clones de erva-mate (AC1 e BC1).

Foram detectados 132 compostos na análise do ciclo diurno e noturno (Tabela 12). Destes compostos, 64 foram identificados (48,5 %). Daqueles não identificados a maioria está associada a carboidratos, de acordo com os fragmentos de massa (m/z) 217, 205 ou 319, característicos de açúcares e seus derivados. Grande parte destes compostos não identificados, não apresentaram diferenças significativas entre as amostras e/ ou a diferença encontrada se deve pela análise qualitativa (presença e ausência) (vide Apêndice B).

Os aminoácidos glicina, ácido glutâmico, fenilalanina, arginina, asparagina, tirosina, prolina e serina, foram encontrados em todas as amostras e clones, no entanto devido à alta dispersão entre as replicatas (coeficiente de variação acima de 350 %) e a não correlação com nenhum outro composto, os mesmos foram retirados da discussão, como o indicado por Detholoff e colaboradores (2014).

TABELA 12: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS CLONES AC1 E BC1 DURANTE ANÁLISE DO CICLO DIURNO / NOTURNO

(Continua)

																Concentração (µg/g)											
																☐ AC1		■ BC1									
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h											
						média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)										
1	A000489-101	1793,93	Ácido benzóico-1,4-dicarboxílico ^{INT}	2 TMS	221 251 296	148,60 ^a 126,22 ^a	59,30 44,16	ND ^b 181,17 ^a	45,50	ND ^b ND ^b		18,43 ^c ND ^b	32,49	ND ^b 80,88 ^e	29,16	ND ^b ND ^b											
3	A183004-101	1812,68	Ácido benzóico 3,4- dicarboxílico ^{INT}	3 TMS	194 311 370	116,60 ^a ND ^b	29,10	141,47 ^a ND ^b	26,89	ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b		ND ^b 58,61 ^c	18,93	105,95 ^a ND ^b	32,29										
7	A137001-101	1346,94	Ácido fumárico ^{INT}	2 TMS	245 147 83	56,72 ^{a,e} 46,86 ^{d,e}	9,54 43,88	85,02 ^b 98,51 ^b	37,33 46,86	78,39 ^b 61,33 ^b	58,20 42,94	38,65 ^{a,e} 92,58 ^b	59,62 46,38	44,59 ^c 25,01 ^e	3,73 28,65	40,44 ^{a,e} 27,46 ^e	28,27 16,56										
8	A158004-101	1572,85	2-oxo-Ácido glutárico ^{INT}	1 MEOX 2 TMS	186 147 198	14,12 ^a 26,45 ^a	38,74 23,55	22,16 ^a 40,37 ^c	19,48 38,19	ND ^b 29,17 ^a		ND ^b 26,42 ^a		ND ^b 35,04	26,23 ^a 24,15	16,72 ^a 27,59 ^a	45,31 35,23										
9	A105001-101	1044,47	Ácido láctico ^{NS}	2 TMS	117 191 147	13,51 13,33	24,24 72,53	28,86 15,52	73,08 18,00	24,40 27,83	70,35 18,15	7,83 29,60	5,83 38,14	14,72 20,87	16,32 84,06	15,94 15,71	53,92 37,42										
10	A113002-101	1118,32	Ácido oxálico ^{INT}	2 TMS	147 133 190	25,23 ^a 26,51 ^a	55,96 62,89	31,42 ^a 49,50 ^c	68,68 66,38	31,90 ^a 34,79 ^{a,c}	39,04 36,32	13,94 ^b ND ^d	39,93	11,42 ^b 41,16 ^{a,c}	31,31	17,88 ^b 35,43 ^{a,b,c}	4,83 38,69										
12	A134001-101	1310,65	Ácido succínico ^{INT}	2 TMS	247 172 150	59,90 ^{a,d} 101,18 ^b	21,98 26,74	111,38 ^b 137,43 ^{b,c}	22,17 21,11	140,55 ^{b,c} 207,88 ^e	29,19 21,40	61,77 ^a 142,74 ^{b,c}	41,70 16,17	70,90 ^a 54,60 ^{a,d}	25,90	44,27 ^d 41,45 ^d	51,76 37,19										
13	A115003-101	1152,05	Álcool benzílico ^{INT}	1 TMS	165 136 166	72,36 ^a 79,53 ^{a,d}	10,90 20,48	101,56 ^b 173,54 ^{c,e}	11,52 12,48	160,36 ^c 108,33 ^{b,f}	21,92 9,97	6,25 ^d 155,87 ^{c,e,g}	24,66 10,46	111,48 ^b 71,17 ^{a,d}	19,95	64,49 ^a 60,20 ^{a,d}	15,89 13,50										
15	A205001-101	2045,44	Ácido hexadecanoico ^{INT}	1 TMS	117 131 313	83,09 ^a 101,17 ^{a,b,c}	16,48 16,65	113,60 ^b 100,32 ^{a,b,c}	12,52 9,85	93,35 ^{a,b,c} 130,42 ^{e,b}	24,26 14,35	86,31 ^{a,c} 160,87 ^f	2,59 15,61	71,17 ^{a,b,c} 89,06 ^{a,b,c}	27,84	72,29 ^{a,b,c} 83,12 ^{a,b,c}	25,21 16,35										
16	A225002-101	2243,49	Ácido octadecanoico ^{INT}	1 TMS	118 98 84	68,34 ^a 104,81 ^{b,d}	18,82 26,96	93,36 ^b 236,00 ^{c,e}	17,71 11,83	211,24 ^c 108,05 ^{b,d}	22,21 11,65	81,00 ^b 140,34 ^f	18,67 13,59	60,57 ^a 76,03 ^{b,d}	29,30	61,97 ^a 67,29 ^a	27,90 17,87										
86	A209001-101	2068,66	Alantoina ^{INT}	3 TMS	116 101 173	51,92 ^a 52,25 ^a	20,52 37,32	94,70 ^b 109,01 ^{b,c}	35,05 18,06	95,96 ^b 108,82 ^{b,c}	33,75 38,24	49,46 ^a 140,73 ^{b,c}	49,70 39,94	66,68 ^{a,b} 39,47 ^a	58,27	43,16 ^{a,b} 65,18 ^{a,b}	63,74 45,66										
87	A128002-101	1259,94	Etanolamina ^{INT}	3 TMS	100 86 174	50,63 ^a 54,58 ^a	40,20 12,85	85,82 ^b 62,29 ^{a,b}	26,77 23,15	73,32 ^b 65,93 ^{a,b}	18,05 7,85	62,54 ^{a,b} 96,88 ^{c,b}	48,54 24,11	50,82 ^a 50,21 ^{a,b}	25,13	41,77 ^a 54,50 ^{a,b}	32,99 17,06										
92	A199001-101	1977,47	(Z) Ácido cafeico ^{INT}	3 TMS	220 396 219	20,52 ^a 22,27 ^a	30,14 46,23	22,79 ^a 22,72 ^a	26,72 32,93	23,69 ^a ND ^b	44,30	30,74 ^a ND ^b	28,72	15,95 ^a 13,33 ^a	34,73	28,31 ^a ND ^b	21,32										
95	A299001-101	2981,68	(Z) Ácido-3-cafeiolquínico ^{INT}	6 TMS	345 256 219	23,24 ^a 34,47 ^{a,b}	39,94 50,39	12,28 ^a 37,65 ^{a,b}	35,21 50,19	12,47 ^a 32,41 ^{a,b}	35,61 47,69	5,46 ^b 40,39 ^{a,b}	63,90 40,00	26,12 ^{a,b} 28,05 ^{a,b}	48,56	43,69 ^{a,b} 21,28 ^{a,b}	27,73 53,53										
96	A311001-101	3099,59	(E) Ácido-3-cafeiolquínico ^{NS}	6 TMS	345 256 307	15,30 31,51	25,15 66,21	6,68 31,28	72,88 78,05	6,64 14,34	37,61 69,79	59,17 37,94	72,54 51,48	27,17 33,13	8,96	59,78 18,22	14,66 61,64										
97	A317001-101	3154,54	(E) Ácido-4-cafeiolquínico ^{NS}	6 TMS	373 484 447	14,64 19,59	23,19 58,82	7,51 24,09	51,17 73,43	9,14 11,74	41,16 62,33	49,15 37,44	88,16 48,25	37,43 17,56	86,96	47,12 15,81	5,49 25,46										
99	A319001-101	3177,08	(E) Ácido-5-cafeiolquínico ^{INT}	6 TMS	255 357 447	23,96 ^a 49,86 ^{a,b,c}	22,19 69,39	12,58 ^a 39,87 ^{a,b,c}	63,11 71,33	12,09 ^a 16,82 ^{a,b}	37,12 62,20	80,23 ^b 53,23 ^{a,b}	6,25 49,64	43,92 ^{a,b,c} 49,38 ^{a,b}	86,30	96,26 ^{b,c} 29,63 ^{a,b}	1,97 48,16										
100	A232002-101	2292,48	Frutose-6-fosfato ^{INT}	1 MEOX 6 TMS	315 299 316	84,67 ^{a,b} 99,88 ^{a,b}	20,69 41,55	143,74 ^{a,b} 95,47 ^{a,b}	13,57 18,81	128,54 ^{a,b} 167,66 ^b	45,72 32,64	56,96 ^a 142,72 ^{a,b}	38,34 33,69	75,76 ^{a,b} 73,58 ^{a,b}	38,68	77,24 ^{a,b} 140,63 ^{a,b}	38,60 44,60										
101	A233002-101	2307,34	Glicose-6-fosfato ^{INT}	1 MEOX 6 TMS	89 103 129	52,57 ^a 66,05 ^a	13,73 29,27	126,42 ^b 101,65 ^b	21,62 19,20	96,72 ^{b,c} 96,95 ^{b,c}	15,46 36,08	47,45 ^a 98,06 ^{b,c}	38,47 32,83	63,75 ^{a,c} 61,37 ^{a,c}	34,59	58,66 ^a 89,13 ^{b,c}	17,11 44,30										
102	A129001-101	1261,98	Ácido glicérico-3-fosfato ^{INT}	4 TMS	299 357 227	48,78 ^a 82,74 ^{b,d}	40,46 79,69	70,63 ^b 53,57 ^{a,b}	28,93 51,69	ND ^c 51,88 ^{a,b}		ND ^c ND ^c		34,29 ^a 48,32 ^{a,b}	39,33	41,14 ^a 51,35 ^{a,b}	59,36 46,90										
103	A119001-101	1165,67	Ácido fosfórico ^{INT}	3 TMS	299 193 283	44,50 ^a 59,13 ^{a,e}	29,60 31,73	132,21 ^b 92,46 ^c	28,72 29,75	115,96 ^{b,c} 124,90 ^b	37,50 42,04	75,25 ^{a,b,e} 158,99 ^b	55,65	58,56 ^{a,c,e} 28,76 ^{a,d}	47,83	35,38 ^a 63,15 ^e	16,76 32,16										

(Continua)

Concentração (µg/g)																	
□ AC1 ■ BC1																	
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Grupos adicionais	ragmentos (m/z)	12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h	
						média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)
104	A154001-101	1528,59	Ácido fosfórico monometil ester ^{INT}	2 TMS	163 211 243	49,10 ^a 52,19 ^a	20,15 38,71	95,96 ^b 79,99 ^b	58,34 44,70	97,89 ^b 64,80 ^{a,b}	20,99 38,36	38,75 ^a 135,18 ^{b,c}	37,55 35,61	37,50 ^a 24,22 ^a	39,70 35,46	36,88 ^a 63,19 ^{a,b}	37,24 44,96
105	A154001-101	1528,59	Ácido eritrônico ^{INT}	4 TMS	217 205 292	49,14 ^a 74,16 ^{b,d}	12,53 28,40	98,32 ^b 101,29 ^{b,d}	8,28 21,48	93,83 ^b 106,89 ^{b,a}	28,85 38,61	6,73 ^c 140,83 ^f	34,82 13,97	54,62 ^a 42,89 ^a	15,35 37,45	49,91 ^a 64,86 ^{a,b}	42,67 26,57
106	A204001-101	2030,47	Ácido galactárico ^{INT}	6 TMS	143 189 334	28,59 ^a 42,32 ^{a,b}	17,44 38,81	44,73 ^{a,b} 56,80 ^{a,b}	24,18 27,23	62,47 ^b 60,38 ^b	40,31 18,99	48,74 ^{a,b} 90,23 ^c	26,75 11,51	33,82 ^{a,b} 35,21 ^{a,b}	14,56 40,02	28,22 ^a 64,82 ^b	28,57 35,31
112	A156001-101	1545,94	Ácido treônico ^{INT}	4 TMS	217 294 189	28,87 ^a 95,82 ^a	40,24 83,93	46,14 ^a 96,55 ^a	22,11 41,96	48,23 ^a 84,83 ^a	39,01 45,78	40,69 ^a 163,61 ^{a,c}	77,49 39,92	37,55 ^{a,b} 36,23 ^{a,b}	31,37 47,12	48,67 ^a 31,01 ^a	87,28 30,90
113	A129003-101	1262,29	Glicerol ^{INT}	3 TMS	205 217 129	66,75 ^{a,b} 58,83 ^{a,b}	53,01 30,40	98,10 ^{a,b} 67,00 ^{a,b}	18,71 24,11	94,16 ^{a,b} 92,30 ^{a,b}	23,25 26,98	65,93 ^{a,b} 116,04 ^b	35,52 18,60	65,84 ^{a,b} 69,62 ^{a,b}	21,89 73,21	54,16 ^a 73,82 ^{a,b}	43,87 18,06
114	A140012-101	1401,60	Hidroquinona ^{HR}	2 TMS	254 239 112	15,75 ^a ND ^b	82,57 ND ^b	ND ^b 82,86 ^c	37,29 ND ^b	158,34 ^c ND ^b	35,34 ND ^b	ND ^b ND ^b	76,55 ^c 12,40 ^a	42,39 23,89	36,54 ^a ND ^b	63,36 ND ^b	
115	A209002-101	2080,20	<i>mio</i> - Inositol ^{INT}	6 TMS	217 318 432	73,02 ^a 148,28 ^b	18,83 21,47	176,15 ^b 183,51 ^b	5,97 14,69	155,90 ^b 216,00 ^d	8,51 33,03	114,89 ^c 269,08 ^e	24,21 2,97	127,97 ^{b,c} 99,95 ^a	2,57 36,26	103,94 ^{b,c} 155,50 ^{a,b,c}	31,85 51,23
116	A173001-101	1712,74	Ribitol ^{INT}	5 TMS	205 217 319	16,80 ^a 41,04 ^b	18,10 31,69	30,27 ^{a,b} 37,88 ^{b,c,d}	23,03 17,46	34,82 ^b 44,44 ^{b,c}	33,39 24,09	21,35 ^{a,b,c} 44,61 ^b	1,57 20,88	23,29 ^{a,b,d} 31,41 ^{b,c,d,e}	31,17 58,10	18,47 ^{a,b,e} 28,74 ^{a,b,c,d,e}	26,99 22,86
124	A299002-101	2966,29	Galactinol ^{INT}	9 TMS	204 217 191	86,19 ^{a,c} ND ^b	27,49 ND ^b	104,94 ^{a,c} 139,50 ^{a,c}	41,04 22,33	120,81 ^{a,c} 169,85 ^{a,c}	24,85 41,29	81,49 ^{a,c} 171,62 ^{a,c}	28,13 36,79	89,33 ^{a,c} 110,39 ^c	29,59 39,82	75,46 ^a 112,43 ^{a,c}	28,48 49,02
127	A173002-101	1714,66	Fucose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS	117 160 277	47,45 ^a 87,72 ^{a,b}	36,72 40,79	77,31 ^{a,b} 74,03 ^{a,b}	26,82 37,72	120,28 ^{a,b} 86,25 ^b	32,03 15,73	65,84 ^{a,b} 93,66 ^{a,b}	41,23 43,45	100,12 ^{a,b} 67,23 ^{a,b}	16,20 31,42	64,14 ^{a,b} 103,71 ^{a,b}	36,44 38,40
131	A274001-101	2719,80	Maltose ^{INT}	1 MEOX 8 TMS	319 205 361	ND ^a 39,30 ^b	48,99 ^b 43,31	21,96 ^a 41,36 ^b	21,96 40,67	84,41 ^c 105,92 ^c	30,42 31,24	42,46 ^b 147,62 ^d	21,31 32,24	97,47 ^c 71,69 ^c	44,40 67,61	56,50 ^b 61,23 ^b	27,74 40,46
134	A168002-101	1665,99	Ribose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS	217 307 191	93,44 ^a 137,68 ^d	16,79 24,11	175,07 ^b 181,58 ^b	7,65 21,91	170,01 ^b 169,56 ^b	12,30 20,71	53,23 ^c 157,70 ^b	32,38 29,55	79,49 ^a 94,29 ^{a,c}	38,82 61,60	61,80 ^{a,c} 107,68 ^a	43,51 48,62
135	A166012-101	1665,98	Ribulose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS	217 307 191	41,00 ^{a,b} 68,08 ^{a,b,c,d}	12,24 44,55	77,08 ^{a,b} 81,89 ^{a,b,c,d}	15,26 38,93	88,51 ^a 88,72 ^{a,b,d}	28,42 22,46	30,33 ^{b,c} 110,39 ^{a,b}	35,15 54,13	45,17 ^{a,b,d} 39,75 ^{a,b,c,d}	3,85 37,09	44,38 ^{a,b} 63,82 ^{a,b,c,d}	48,91 47,81
139	A182004-101	1803,92	Ácido cítrico ^{INT}	4 TMS	273 211 465	31,73 ^{a,b,d} 34,70 ^{a,b,c,d}	31,58 75,71	53,60 ^{a,d} 68,55 ^{a,b,d}	33,58 47,56	41,37 ^{a,b,d} 53,05 ^{a,b,d}	47,00 59,65	30,43 ^{a,b,d} 124,78 ^{a,b,d}	5,47 37,65	28,83 ^{a,b,d} 10,41 ^{b,c,d}	44,21 40,93	30,75 ^{a,b,d} 19,66 ^{a,b,c}	35,19 57,12
140	A149001-101	1479,34	Ácido málico ^{INT}	3 TMS	233 189 147	88,15 ^a 79,99 ^a	10,11 66,41	168,01 ^b 186,52 ^b	16,21 44,90	112,10 ^a 117,71 ^a	50,62 59,02	45,63 ^c 157,13 ^b	33,26 16,62	31,37 ^c 25,40 ^c	27,34 50,99	68,11 ^{a,c} 31,01 ^c	42,52 26,23
143	A198006-101	1959,24	Glucopirranose ^{NS}	5 TMS	204 191 233	3,40 12,02	18,04 148,66	4,01 1,62	55,73 32,37	4,66 2,68	79,15 32,61	4,93 2,22	32,63 73,45	14,40 8,52	118,97 88,35	2,94 5,87	7,93 35,83
145	A264001-101	2623,04	Sacarose ^{INT}	8 TMS	217 271 361	223,44 ^a 291,83 ^c	22,07 37,94	355,43 ^b 332,72 ^b	28,22 34,60	385,60 ^b 487,95 ^d	32,87 29,16	268,23 ^c 576,38 ^e	27,47 26,29	249,58 ^a 169,18 ^f	31,46 15,53	227,17 ^a 374,56 ^b	42,77 41,51
146	A185011-101	1878,67	Cafeína ^{INT}		194 109 82	34,19 ^a 25,02 ^{a,c}	29,87 61,66	54,29 ^b 25,39 ^{a,c}	23,59 54,90	38,99 ^{a,b} 40,97 ^{a,b}	29,89 59,93	27,35 ^{a,b} 50,59 ^b	46,20 25,89	28,42 ^b 11,74 ^c	24,34 52,60	30,55 ^a 7,67 ^c	23,47 47,90
2	A128003-101	1250,39	Ácido benzóico ^{HR}	1 TMS	105 135 179	71,70 ^{A,B} 67,23 ^{A,B}	41,45 23,19	69,25 ^{A,B} 82,07 ^{A,B}	14,48 21,48	76,59 ^A 76,29 ^A	11,75 22,36	58,74 ^{A,B} 99,88 ^{A,B}	52,85 18,90	40,38 ^B 60,26 ^B	18,18 51,18	60,59 ^{A,B} 67,99 ^{A,B}	35,99 49,20
4	A158007-101	1568,99	3-hidroxi-ácido benzóico ^{NS}	2 TMS	267 193 223	117,20 107,59	42,41 32,38	122,73 102,43	31,95 62,30	115,15 115,43	48,66 53,75	148,37 157,19	73,35 29,21	56,32 58,55	54,62 43,25	91,16 67,76	3,78 37,45
5	A164003-101	1633,29	4-hidroxi-ácido benzóico ^{HR}	2 TMS	193 267 223	93,77 ^{A,B} 86,77 ^{A,B}	44,00 32,48	83,84 ^{A,B} 79,73 ^{A,B}	53,82 60,64	96,07 ^A 96,98 ^{A,B}	41,62 54,49	64,32 ^A 131,28 ^{A,B}	69,41 24,77	46,33 ^B 46,43 ^{A,B}	58,86 48,99	74,12 ^{A,B} 58,06 ^{A,B}	27,25 45,28
11	A181002-101	1794,63	Ácido chiquimico ^{HR}	4 TMS	204 255 190	99,78 ^{A,B} 94,81 ^{A,B}	12,38 19,59	132,12 ^A 118,25 ^A	6,72 13,39	89,34 ^{A,B} 86,95 ^{A,B}	4,20 15,20	75,53 ^{A,B} 104,61 ^{A,B}	4,69 13,53	66,35 ^B 74,79 ^B	12,92 38,56	68,77 ^B 71,81 ^B	31,93 27,93

(Conclusão)

Concentração (µg/g)																		
□ AC1 ■ BC1																		
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Grupos adicionais	ragmentos (m/z)	12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h		
						média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	
17	A306002-101	3077,52	Campferol ^{NS}	5TMS	559 133 560	56,56	25,75	66,37	19,83	55,89	48,30	44,44	15,77	45,16	33,16	49,63	18,15	
						84,62	18,70	68,26	13,69	104,87	73,35	78,20	30,74	50,13	21,17	57,84	49,06	
90	A191004-101	1913,02	Tiramina ^{NS}	3 TMS	175 338 250	15,82	84,80	21,34	56,45	19,31	45,87	24,82	33,73	33,63	57,42	26,23	25,27	
						62,40	96,51	26,77	89,32	21,89	53,39	28,68	23,82	84,33	62,76	92,69	12,61	
93	A214001-101	2135,55	(E) Ácido cafeico ^{HR}	3 TMS	219 382 397	17,24 ^{A,B}	66,64	21,85 ^{A,B}	52,13	21,75 ^{A,B}	26,62	32,50 ^A	3,58	13,29 ^B	43,83	25,73 ^{A,B}	46,47	
						26,34 ^{A,B}	43,76	26,32 ^{A,B}	28,52	19,98 ^{A,B}	53,05	31,05 ^A	49,79	16,64 ^B	42,17	14,63 ^{A,B}	32,40	
98	A301002-101	2988,16	(Z) Ácido-5-cafeiolquinico ^{HR}	6 TMS	307 345 147	21,60 ^{A,B}	43,00	10,37 ^{A,B}	51,84	10,15 ^A	51,39	41,56 ^B	5,84	21,68 ^{A,B}	52,73	40,95 ^{A,B}	28,79	
						27,28 ^{A,B}	48,68	21,56 ^{A,B}	65,75	14,09 ^A	56,62	28,13 ^B	32,48	24,35 ^{A,B}	94,29	16,90 ^{A,B}	62,46	
107	A199002-101	1980,49	Ácido galactônico ^{NS}	6 TMS	103 129 204	54,26	25,12	72,14	14,94	58,24	27,57	57,30	17,49	46,54	25,76	61,72	67,83	
						116,89	34,38	115,15	8,16	93,09	18,37	129,66	31,19	108,38	55,17	82,70	43,53	
108	A200001-101	1984,52	Ácido glucônico ^{HR}	6 TMS	319 189 319	ND ^A		16,11 ^B	24,80	ND ^A		ND ^A		11,19 ^B	41,43	ND ^A		
						ND ^A		8,52 ^B	31,26	ND ^A		ND ^A		9,21 ^B	23,78	ND ^A		
109	A135003-101	1319,94	Ácido glicérico ^{HR}	3 TMS	292 189 130	83,96 ^{A,C,D}	24,64	15,57 ^{A,C}	2,45	81,43 ^{A,B,C,D}	43,72	58,88 ^{A,B,C,D}	34,34	49,22 ^{B,C,D}	54,81	75,28 ^{A,B,D}	3,46	
						123,38 ^{A,C,D}	36,73	128,09 ^{A,C}	41,50	98,84 ^{A,B,C,D}	20,18	103,65 ^{A,B,C,D}	19,67	50,65 ^{B,C,D}	54,53	47,54 ^{A,B,D}	42,84	
110	A177001-101	1751,51	Ácido ribônico ^{HR}	5 TMS	292 333 293	65,23 ^A	24,23	77,79 ^A	5,89	67,07 ^A	53,68	57,19 ^{A,B}	5,98	36,86 ^B	13,95	4,50 ^C	37,65	
						67,28 ^A	20,70	82,12 ^A	16,92	74,23 ^A	28,27	93,82 ^{A,B}	10,13	46,35 ^B	30,26	47,83 ^C	21,16	
111	A201001-101	2000,79	Ácido sacárico ^{HR}	6 TMS	333 143 189	33,44 ^{A,B}	1,43	48,24 ^{A,B}	11,39	45,95 ^{A,B}	17,93	52,94 ^A	45,97	33,94 ^B	27,88	39,46 ^B	29,27	
						60,98 ^{A,B}	32,73	75,01 ^{A,B}	32,72	79,27 ^{A,B}	27,91	94,79 ^A	19,81	41,38 ^B	38,85	45,54 ^B	34,79	
122	A127003-101	1236,16	Dietilenoglicol ^{NS}	2 TMS	117 145 131	71,36	35,88	90,72	9,79	71,92	34,79	59,95	22,70	49,11	27,38	58,72	24,34	
						75,14	25,66	79,47	19,52	99,47	19,56	123,19	18,91	78,85	69,14	67,26	25,72	
125	A167002-101	1650,62	Arabinose ^{NS}	1 MEOX 4 TMS	217 189 205	2,86	42,78	9,45	36,63	23,00	47,18	14,50	7,24	24,71	46,76	23,36	66,20	
						35,23	107,50	17,39	141,48	21,86	132,25	7,60	79,68	57,48	43,56	69,07	75,74	
126	A187002-101	1853,93	Frutose ^{HR}	1 MEOX 5 TMS	217 307 191	11,72 ^{A,B}	2,62	26,70 ^{A,B}	47,44	40,05 ^A	84,62	33,45 ^{A,B}	131,34	30,48 ^{A,B}	8,94	8,96 ^B	36,61	
						31,46 ^{A,B}	49,06	24,17 ^{A,B}	24,16	34,57 ^A	58,13	29,70 ^{A,B}	33,12	15,54 ^{A,B}	118,24	8,90 ^B	55,38	
128	A188001-101	1876,07	Galactose ^{NS}	1 MEOX 5 TMS	205 217 157	43,89	37,53	74,87	16,63	124,04	38,79	64,42	5,16	76,79	15,15	43,32	4,46	
						69,03	63,92	51,94	63,65	74,57	43,35	73,31	84,60	70,62	52,21	86,52	37,14	
130	A172001-101	1701,20	β-Glicose-1,6-anidro ^{NS}	3 TMS	204 217 143	57,87	32,18	76,62	11,78	63,28	24,44	70,66	37,45	44,99	37,78	57,85	2,27	
						115,74	29,51	99,96	28,28	95,79	16,67	126,00	31,35	89,88	46,28	70,76	15,95	
132	A274001-101	2719,80	Manose ^{NS}	1 MEOX 5 TMS	205 319 160	40,15	33,22	57,14	13,96	99,49	36,24	58,12	56,96	63,83	15,93	39,35	44,97	
						38,55	58,97	34,17	72,77	37,87	51,08	39,59	103,46	50,42	38,11	59,44	46,42	
133	A337002-101	3350,64	Rafinose ^{NS}	11 TMS	205 217 191	31,21	25,57	69,66	22,78	42,24	3,53	41,44	21,35	51,50	42,97	34,35	42,75	
						53,96	42,74	53,98	25,77	59,81	54,30	56,66	48,30	61,59	77,43	50,03	36,11	
137	A165001-101	1645,84	Xilose ^{NS}	1 MEOX 4 TMS	217 189 307	80,78	37,32	112,87	19,97	154,55	33,52	101,95	34,98	112,32	34,45	91,79	33,38	
						103,39	35,82	67,92	29,47	99,76	10,26	106,98	67,34	87,63	72,95	86,94	45,16	
141	A185001-101	1842,69	Ácido quinico ^{HR}	5 TMS	255 191 204	242,14 ^{A,B}	24,29	291,25 ^{A,B}	24,63	238,17 ^A	23,66	199,43 ^B	37,17	169,40 ^{A,B}	26,23	198,68 ^{A,B}	47,46	
						284,64 ^{A,B}	25,50	324,80 ^{A,B}	37,58	370,52 ^A	24,47	384,77 ^B	38,26	169,46 ^{A,B}	15,50	304,90 ^{A,B}	48,08	
142	A177004-101	1755,75	Glucopirranose [-H ₂ O] ^{HR}	4 TMS	217 191 233	27,58 ^{A,B}	48,27	35,78 ^{A,B}	23,22	26,43 ^{A,B}	22,42	39,14 ^A	3,72	24,96 ^B	58,23	28,86 ^B	45,82	
						48,77 ^{A,B}	39,17	41,48 ^{A,B}	13,84	38,97 ^{A,B}	8,64	58,53 ^A	56,41	26,18 ^B	34,96	23,82 ^B	17,32	
144	A189002-101	1880,50	Glicose ^{HR}	1 MEOX 5 TMS	204 130 117	158,40 ^A	28,34	274,67 ^{A,B}	33,78	406,11 ^B	52,72	225,73 ^{A,B}	53,80	240,74 ^{A,B}	39,42	169,31 ^{A,B}	52,54	
						206,85 ^A	56,08	144,88 ^{A,B}	51,78	234,55 ^B	10,38	265,30 ^{A,B}	122,44	178,26 ^{A,B}	24,51	308,90 ^{A,B}	63,77	

Nota: ND compostos não detectados. Letras minúsculas referem-se as diferenças estatísticas observadas p<0,05, com interação (INT) existente entre clones e hora do dia, letras maiúsculas referem-se as diferenças estatísticas observadas p<0,05, sem interação (HR), ou seja, com diferenças existentes apenas entre a luminosidade e não entre clones, NS análise estatística não significativa. As diferenças entre os clones AC1 (em branco) e BC1 (em cinza) são apresentadas entre as linhas da tabela. Para os açúcares redutores foi considerado apenas o maior pico encontrado, via de regra o isômero E.

São observados na Tabela 12 que os ácidos derivados do ácido chiquímico, ácido benzóico 1,4 e 3,4 dicarboxílico (compostos 1 e 3), não foram detectados em todos os horários analisados, bem como maltose (131), ácido glicérico-3-fosfato (102), ácido 2-oxo-glutárico (8), Z-ácido cafeico (92), galactinol (124), sendo que a análise qualitativa, presença e não detecção de um composto ao longo do experimento, é um dos fatores que diferencia os clones AC1 e BC1.

Ainda é visível na Tabela 12 uma alta concentração dos carboidratos em relação aos demais compostos, sendo a sacarose (145) o composto mais abundante encontrado. Entre os compostos específicos da erva mate (compostos bioativos) chama atenção à detecção dos ácidos clorogênicos em seus diferentes isômeros (ácidos 3, 4 e 5 cafeiolquínicos) e estereoisômeros *Z* e *E* (compostos 95, 96, 97, 98 e 99), que apresentaram grande diferença ao longo do tempo, com concentração decrescente em tempos com luminosidade limitada (após o pôr do sol (18h30min h)).

A cafeína (146), diferentemente do esperado, devido ao seu alto fator de herdabilidade (CARDOZO *et al.*, 2010), apresentou grande variação ao longo do dia, com amplitude de 27 e 43 µg/mg para os clones AC1 e BC1, respectivamente, em que, após os primeiros estímulos luminosos sua produção é drasticamente diminuída (Tabela 12). Para o clone AC1 a produção máxima de cafeína ocorre ainda no fotoperíodo, antes do pôr do sol (16h30min), já para o clone BC1 a produção deste metabólito é maior a noite. Já o produto da catabolização da cafeína, a alantoína (86), tem sua concentração, assim como sua precursora, fortemente associada ao genótipo (diferença entre os clones, Tabela 12), sendo que para o clone AC1 seu acúmulo ocorre em período fotossintético e para BC1 em escuro (00h30min).

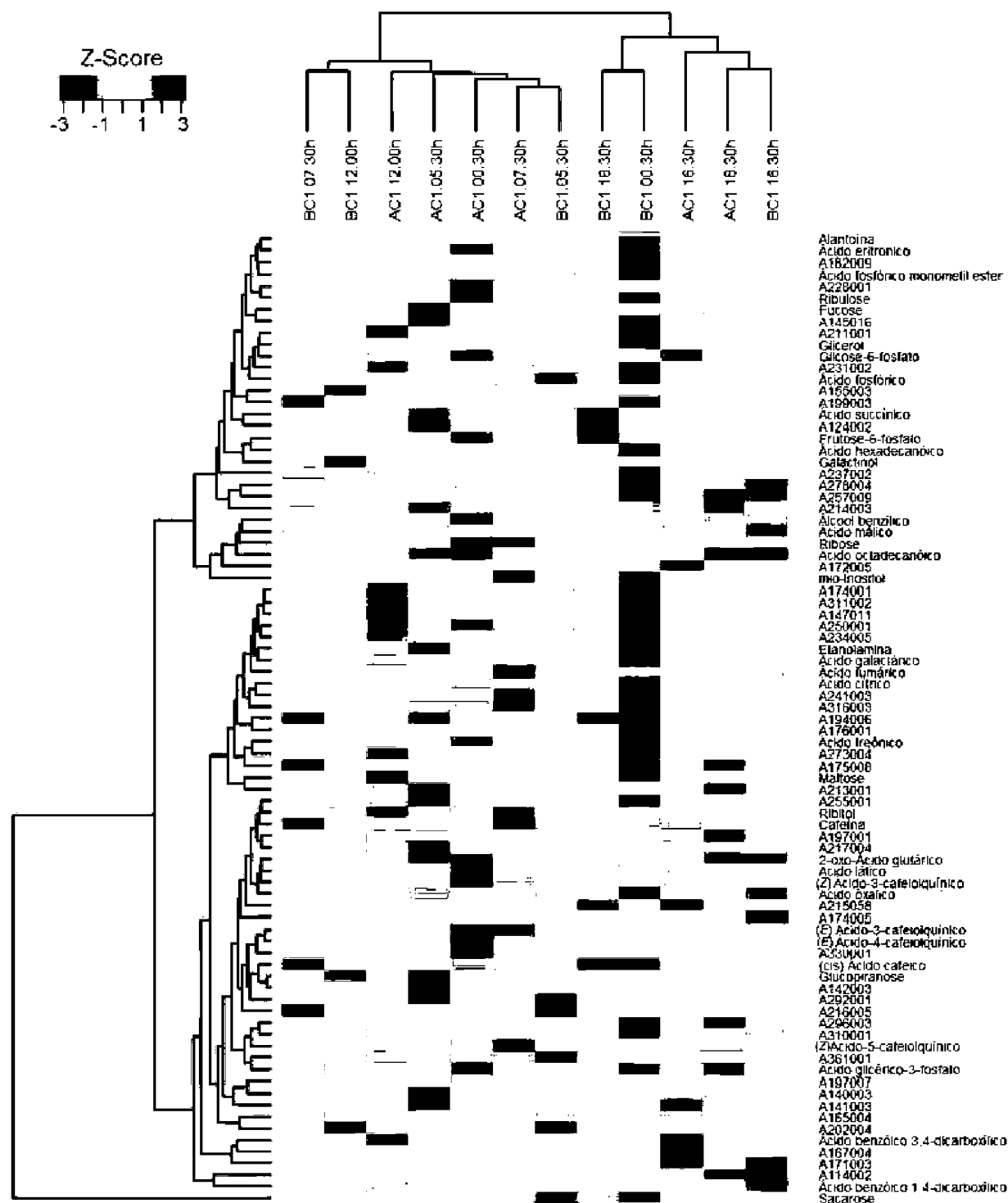
As análises estatísticas (Tabela 12) indicaram que a produção e variação de alguns metabólitos estão mais fortemente relacionadas à adaptação referente à flutuação da luminosidade que, ao genótipo, já que estes apresentaram diferenças em relação ao período do dia, mas não em relação aos clones (relação HR na Tabela 12). Em contrapartida, existem compostos que são regulados tanto pelo fator genotípico, distintos clones, quanto pelo período do dia (relação INT, Tabela 12). Entre os compostos em que a regulação não está fortemente associada às diferenças genotípicas, estão o ácido chiquímico (11), os açúcares redutores frutose

(126), galactose (128) e glicose (144), o estereoisômero *E* do ácido cafeico (93) e o ácido quínico (141).

Ainda na Tabela 12 é possível observar que o isômero *E* do ácido clorogênico (96, ácido-3-cafeiolquínico) possui maior concentração ao longo do tempo em relação a seu isômero *Z* (95), para ambos os clones. Situação contrária ocorre com relação ao ácido neo-clorogênico (98 e 99, ácido-5-cafeiolquínico), sendo que a inversão destes padrões ocorre em períodos com menor luminosidade (após o pôr-do-sol, 18h30min) para o clone AC1. O ácido málico (140) e ácido cítrico (139) tem suas concentrações diminuídas significativamente, em período de máxima escuridão (00:30 h), ao contrário da glicose (144) em que sua produção é maximizada neste período.

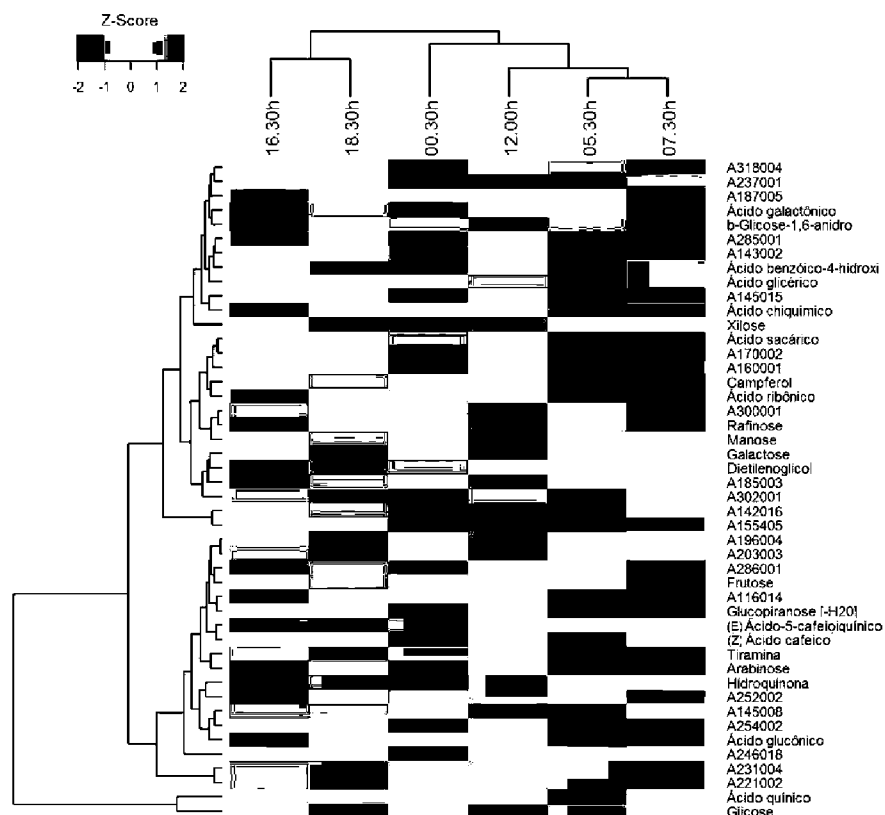
O uso de '*clusters*' (agrupamentos) usados em Análise Hierárquica de Componentes (HCA) pode ser aliado aos mapas de calor ('*HeatMap*'), gerando gráficos multi-informativos em que a estrutura de aglomeração hierárquica em linhas (variáveis) e colunas (amostras) em uma matriz de dados é vista simultaneamente. Os *HeatMaps*, das amostras podem ser visualizados nas Figuras 25 e 26, e mostram as semelhanças matemáticas existentes, através da distância Euclidiana, entre os metabólitos encontrados nos diferentes clones ao longo do tempo. Embora tenham sido desenvolvidos para ver conjuntos de dados genômicos (WU; NOBLE, 2004), o uso desse recurso gráfico tem sido empregado em dados de perfis metabolômicos, já que permitem uma forma de visualização adicional dos dados, ajudando no entendimento das interações que ocorrem na classificação de amostras através do reconhecimento de padrões, em que elementos da matriz metabólica são codificados por cores e grupos adjacentes, indicando as relações funcionais entre variáveis e amostras (IVANISEVIC *et al.*, 2015).

FIGURA 25: MAPA DE CALOR DOS METABÓLITOS INFLUENCIADOS PELO GENÓTIPO (CLONE) E PELA LUMINOSIDADE SEGUNDO TRATAMENTO ESTATÍSTICO



FONTE: O autor (2018):

FIGURA 26: MAPA DE CALOR DOS METABÓLITOS INFLUENCIADOS APENAS PELA LUMINOSIDADE, INDEPENDENTE DO CLONE, SEGUNDO TRATAMENTO ESTATÍSTICO



FONTE: O autor (2018)

O estudo do mapa de calor apresentados nas Figuras 25 e 26 mostram, o padrão existente entre as amostras (colunas) com relação aos metabólitos (linhas), em que o escore Z ('z-score') que representa o valor de expressão dos metabólitos, escalonados, de cada amostra, num gráfico de escala de cores azul-vermelho. Cada retângulo foi colorido em uma escala cores que representa o valor do elemento correspondente da matriz de dados. Assim, as linhas foram ordenadas de tal forma que os fluxos semelhantes (colunas) puderam ser agrupados. A cor vermelha na linha indica alta abundância dos metabólitos e azul indica baixa.

Na Figura 25 é apresentado a aproximação matemática entre os horários de análise 07:30 e 12:00 h para o clone BC1 e maior distanciamento para análise às 05:30 h. Em relação ao clone AC1 as coletas realizadas no período vespertino (16:30 e 18:30 h) se distanciam das demais. As amostras podem ser separadas em quatro grandes grupos, o primeiro formado por AC1 00:30, 05:30, 07:30 e 12:00 h e BC1 05:30 h, o segundo grupo formado por BC1 07:30, 12:00, onde existe uma

menor concentração dos metabólitos encontrados (tons de azul) em relação ao terceiro (BC1 18:30 e 00:30) e quarto grupo (BC1 16:30, AC1 16:30 e 18:30). Padrão semelhante de separação é vista no mapa de calor da Figura 26, onde entre os compostos que não apresentaram interação estatística entre clones e luminosidade, é possível observar que os horários de 07:30 e 05:30 h são mais próximos ao pico de luminosidade às 12:00 h que o restante dos horários analisados, existindo clara distinção na distribuição dos compostos, com valores contrastantes entre período matutino (tons de azul) e o vespertino e noturno (coloração em vermelho). Com relação aos metabólitos, os ácidos clorogênicos apresentam-se próximos entre si, da cafeína, e do (*cis*) ácido cafeico (Figura 25), bem como o ácido quínico da glicose (Figura 26). A sacarose é o composto que mais se distancia dos demais. Os compostos não identificados se agrupam, de modo geral, junto aos demais carboidratos e seus hidratos.

Embora o uso de *HeatMaps* dinamize a percepção dos agrupamentos entre as amostras e os metabólitos, não foram suficientes para explicar a variação dos dados, nem o agrupamento existente entre as primeiras, por isso foi usado como métodos complementares a Análise de Componentes Principais (PCA). A PCA é comumente utilizada em análises de perfil metabólico por permitir uma fácil visualização das amostras (*'scores'*) e verificar quais compostos apresentam maiores influência na distribuição das amostras (*'loadings'*) (MARASCHIN *et al.*, 2017).

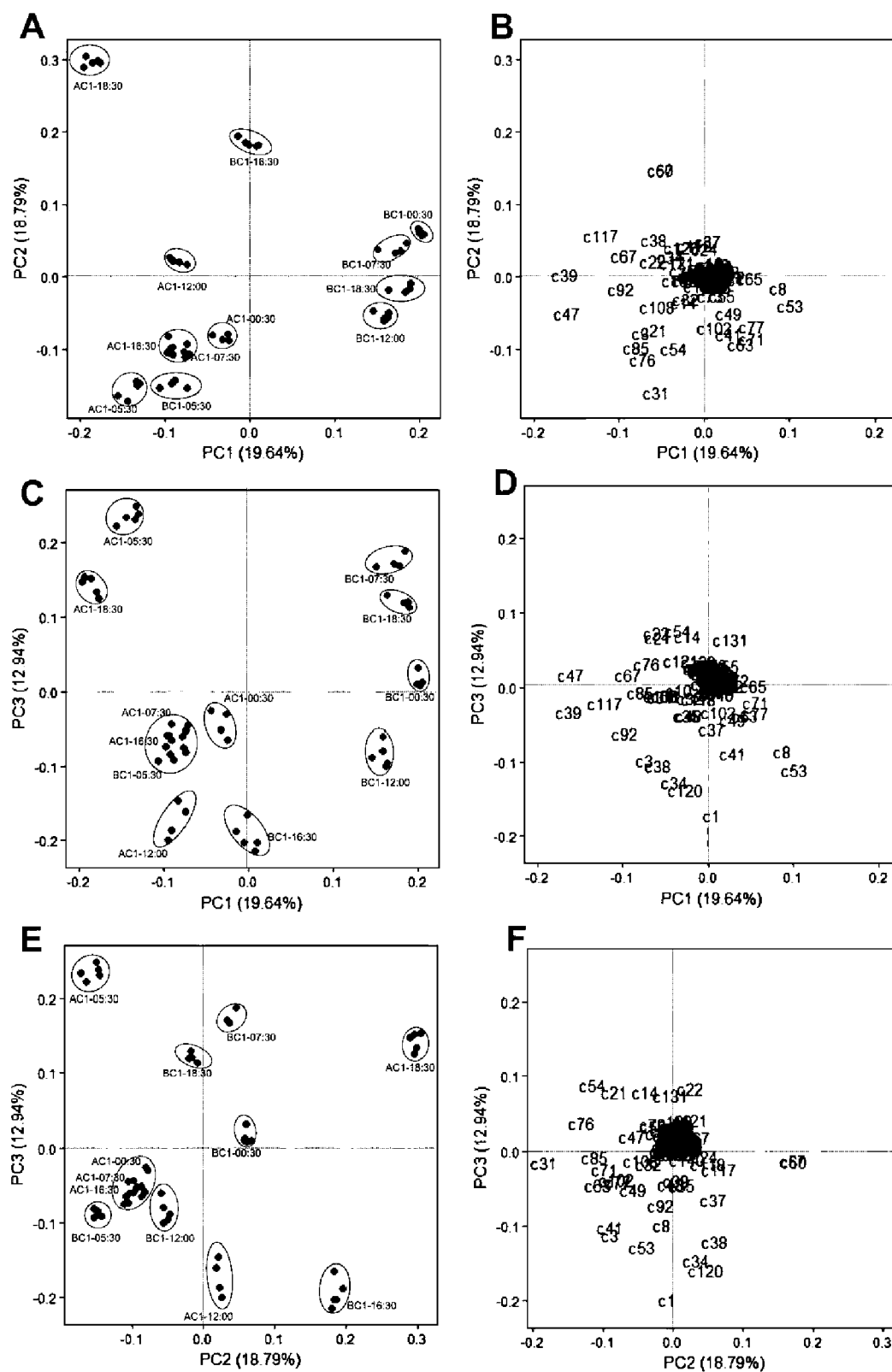
Devido à grande dispersão dos dados e complexidade do sistema, para PCA os valores das concentrações dos compostos foram analisados usando a centralização dos dados. A centralização é um método de dimensionamento que converte todas as concentrações em flutuações em torno de zero, em vez da média das concentrações dos metabólitos (BERG *et al.*, 2006). Por este meio, ajustam-se as diferenças no desvio entre a concentração contrastante dos metabólitos numa mesma amostra. Por isso, é usado para focar na parte flutuante dos dados (BRO; SMILDE, 2001), e deixar apenas a variação relevante, entre as amostras, para análise.

A centralização é aplicada em combinação com outros métodos de transformação sendo a escala logarítmica (log) a mais utilizada (BERG *et al.*, 2006). A transformação de log é a mais empregada para tratamento de dados nas plataformas “ômicas”, por remover a heterocedasticidade (dispersão entre as

observações) dos dados (KVALHEIM; BRAKSTAD; LIANG, 1994), funcionando, portanto, como uma pseudo-escala em que valores de grande magnitude em um conjunto de dados são diminuídos e os menores aumentados, ou seja, as amplitudes entre valores grandes e pequenos nos dados são reduzidas. No entanto, esse efeito raramente é suficiente para se ajustar completamente às diferenças de magnitude, ainda mais quando na presença de desvio padrão elevado, comum em dados metabolômicos, e por isso devem ser associadas a um método de dimensionamento (BERG *et al.*, 2006). A associação da centralização dos dados com a escala logarítmica fornece como principal transformação a razão logarítmica centrada ('centred log-ratio' – CLR), que possui como principal limitação à incapacidade de atuar na presença do valor zero, pois a transformação de log é invalidada em valor nulo (KVALHEIM; BRAKSTAD; LIANG, 1994). Para ultrapassar esta dificuldade todos os valores nulos devem ser convertidos para valores positivos inferiores ao limite mínimo de detecção (LD), normalmente usa-se $LD/\sqrt{2}$ (CROGHAN; EGEGHY, 2003). No caso, calculado em $0,035 \mu\text{g g}^{-1}$ para as amostras, procedimento esse chamado pelos autores de língua inglesa de 'zero-replacement' (substituição de zeros) (AITCHISON; 1986).

Após a transformação dos dados à CLR, procedeu-se a aplicação da análise em componentes principais (PCA), com o objetivo de extrair as eventuais correlações existentes entre os vários metabólitos encontrados em cada um dos clones e horários estudados, com o objetivo principal de capturar a maior parte da variabilidade dos dados utilizando o menor número possível de componentes extraídos. Assim, para melhor separação das amostras e, explicação do sistema, foram necessárias 3 PCs (componentes principais), que juntas explicam 51 % dos dados (Figura 27).

FIGURA 27: (A, C, E) SCORES DO CONJUNTO DE AMOSTRAS DE FOLHAS ADULTAS DOS CLONES AC1 E BC1 DE ERVA-MATE COLETADAS AO LONGO DO DIA. (B, D, F) LOADINGS DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS DOS EXTRATOS). A IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PODE SER VISUALIZADA NA TABELA 12



FONTE: O autor (2018).

Ao analisar a Figura 27A nota-se que PC1 separa os clones AC1 (valores negativos) dos BC1 (valores positivos), com exceção da análise feita às 05:30 h para esse último clone. Em valores negativos de PC2 (Figura 27A, E), têm-se a separação da coleta às 18:30 h, para ambos os clones, e separação do clone AC1 às 12:00 h e do clone BC1 às 00:30 h e 07:30 h das demais amostras. Em PC3 existe a segmentação, em valores positivos do clone BC1 às 18:30, 00:30 e 07:30 horas dos demais horários e do clone AC1 às 18:30 e 05:30 das demais amostras (Figura 27C, E). Em todos os gráficos de scores mostrados vê-se o agrupamento das amostras coletadas às 07:30 e 16:30 h para o clone AC1 e 05:30 h para clone BC1, padrões de separação similares aos demonstrados nos mapas de calor (Figuras 25 e 26).

Os compostos que mais se distanciaram da aglomeração dos metabólitos em 'loadings' (3, 8, 21, 22, 30, 31, 38, 39, 41, 47, 49, 53, 54, 57, 63, 67, 85, 92, 102, 108, 117) foram os que mais influenciaram a distribuição dos dados, sendo que destes apenas quatro foram identificados: 3 (ácido benzóico 3,4-dicarboxílico), 8 (ácido-2-oxoglutárico), 92 (Z-ácido cafeico) e 108 (ácido glucônico), em que a não detecção em todas as amostras pode ter sido fator para separação dos grupos. O composto ácido benzóico 3,4-dicarboxílico não foi detectado em clone BC1 às 05:30 h e apresenta maior concentração em AC1 16:00 h (Tabela 12), fato que auxiliou na separação destes grupos de amostras. O ácido-2-oxoglutárico apresentou maior concentração em BC1 (16:30 h, Tabela 12), sendo que não foi detectado em clone AC1 em coletas realizadas às 18:30, 00:30 e 05:30 h. O Z-ácido cafeico foi detectado em todas as amostras de AC1 com maior concentração na coleta realizadas às 00:30 h (Tabela 12). Já o ácido glucônico (108), só foi detectado nas amostras de 16:30 e 05:30 h de ambos clones.

A separação em PC1, dos dois materiais genéticos estudados sugere que a regulação dos compostos frente aos ritmos diurno/noturno está fortemente associada aos diferentes genomas (AC1 diferente de BC1). Logo, clones diferentes farão adaptações distintas frente às mudanças da luz do ambiente, sendo que estas regulações, para o metabolismo primário, muitas vezes são sutis (ESPINOZA *et al.*, 2010) o que dificultou a separação clara de grupos entre os horários analisados (Figura 27). No entanto, é possível verificar uma tendência na separação das amostras coletadas nos horários de 12:00, 18:30 e 00:30 h dos demais, para ambos clones.

Como anteriormente mencionado a expressão gênica, ou seja, o fenótipo pode ser alterado na decorrência de mudanças no ambiente (KIELBOWICZ-MATUK; CZARNECKA, 2014), e a variação da claridade em ciclos circadianos é um dos diversos fatores que atuam nessas mudanças metabólicas. Além disso, a expressão pode ser diferente mesmo em organismos com o mesmo genótipo (repetições de um mesmo clone), fato que explica a alta amplitude de variação (CV) para os metabólitos (Tabela 12).

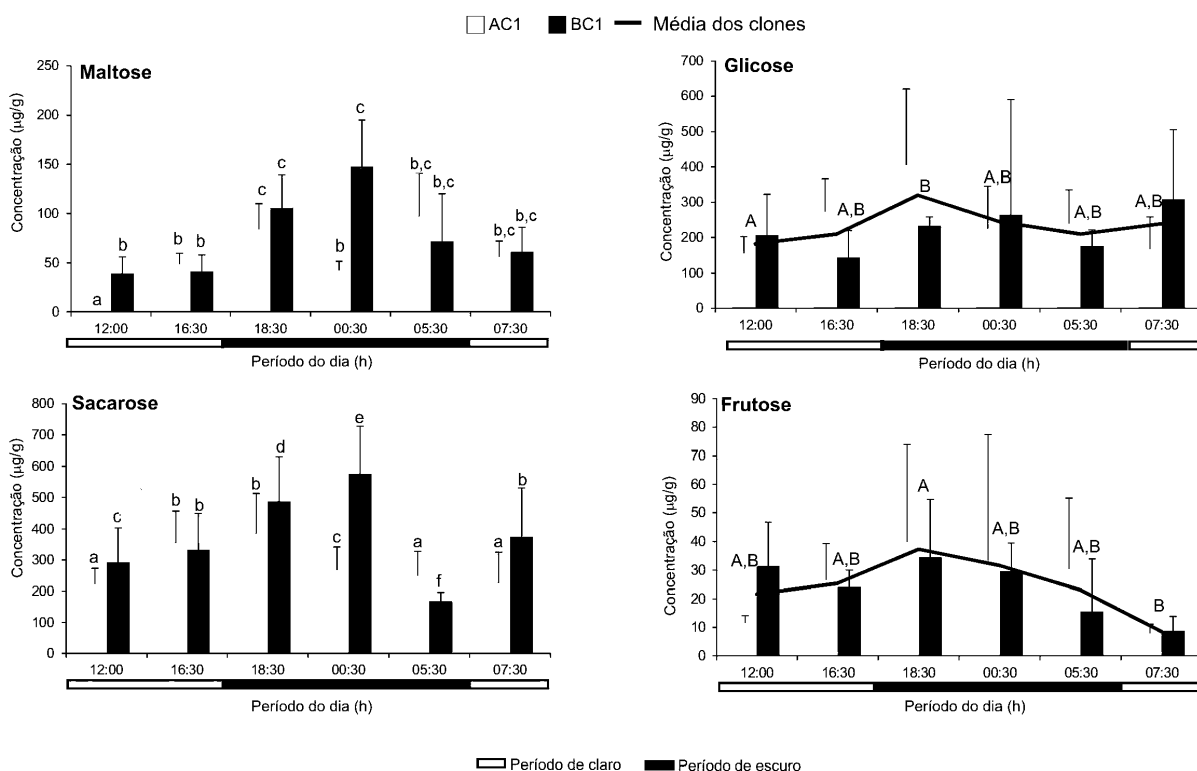
De acordo com os dados apresentados, entre os compostos fortemente coordenados pelo relógio circadiano, estão os açúcares. Todos os processos bioquímicos nas plantas estão associados ao metabolismo de carbono, fixado na fotossíntese e transportado através da glicólise (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim é natural que esses compostos sejam os mais relevantemente afetados em relação à expressão fenotípica, independentemente do clone, ou seja, a maioria não apresentou diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 em períodos de claro e escuro (mapa de calor Figuras 25 e 26). Prova disso é a maior concentração de carboidratos redutores (Tabela 12, Figura 28), principalmente os produtos da degradação da sacarose, frutose (126) e glicose (144), após o pôr-do-sol e seu consumo antes do nascer do sol. Da mesma forma, para sacarose (145), ocorre o pico de produção em escuro, sendo esse efeito mais pronunciado para o clone BC1 (Figura 28), mesmo padrão observado para maltose (131), o que justifica, em parte, o agrupamento em PCA (Figura 27A) e nos mapas de calor dos horários de 00:30 e 05:30 h, para o clone AC1 (Figuras 25 e 26).

O pico de produção, para esses carboidratos, em escuro era esperado, uma vez que as plantas, normalmente, crescem em um ciclo claro/escuro, fornecendo um sistema flexível para analisar a dinâmica temporal das mudanças na expressão gênica e no metabolismo, sendo que perante luz, a fixação fotossintética de CO₂ impulsiona a síntese de sacarose nas folhas, que pode ser consumida pelas células em que é produzida (na forma de glicose e frutose), transportada para outros tecidos como fonte de energia, ou armazenada para uso posterior. Assim, o carbono fixo, principalmente na forma de sacarose (ESPINOZA *et al.*, 2010) e maltose (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004) é armazenado como amido no cloroplasto para uso durante a noite, quando a planta não consegue fotossintetizar.

Estudos anteriores demonstraram que existe um grupo de enzimas específicas que convertem o amido em sacarose e, essa, é transportada pelo floema

para posterior utilização em vias metabólicas (HARMER *et al.*, 2000), bem como ocorre com a maltose (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004). Logo, é congruente, que exista a produção de maltose, sacarose e seus derivados em períodos de baixa luminosidade (Figura 28), sendo consumidos antes do período fotossintético, no qual o consumo e produção são mantidos pela fixação de CO₂ sem requisição da catabolização de amido. O armazenamento de açúcar para uso posterior em escuro, para erva-mate, foi dependente do genótipo, o que sugere que o clone AC1 deve usar fontes de carbono em atividades diferentes em escuro.

FIGURA 28: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS AÇÚCARES MALTOSE, SACAROSE, GLICOSE E FRUTOSE, NOS DIFERENTES CLONES DE ERVA-MATE FRENTE À DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE



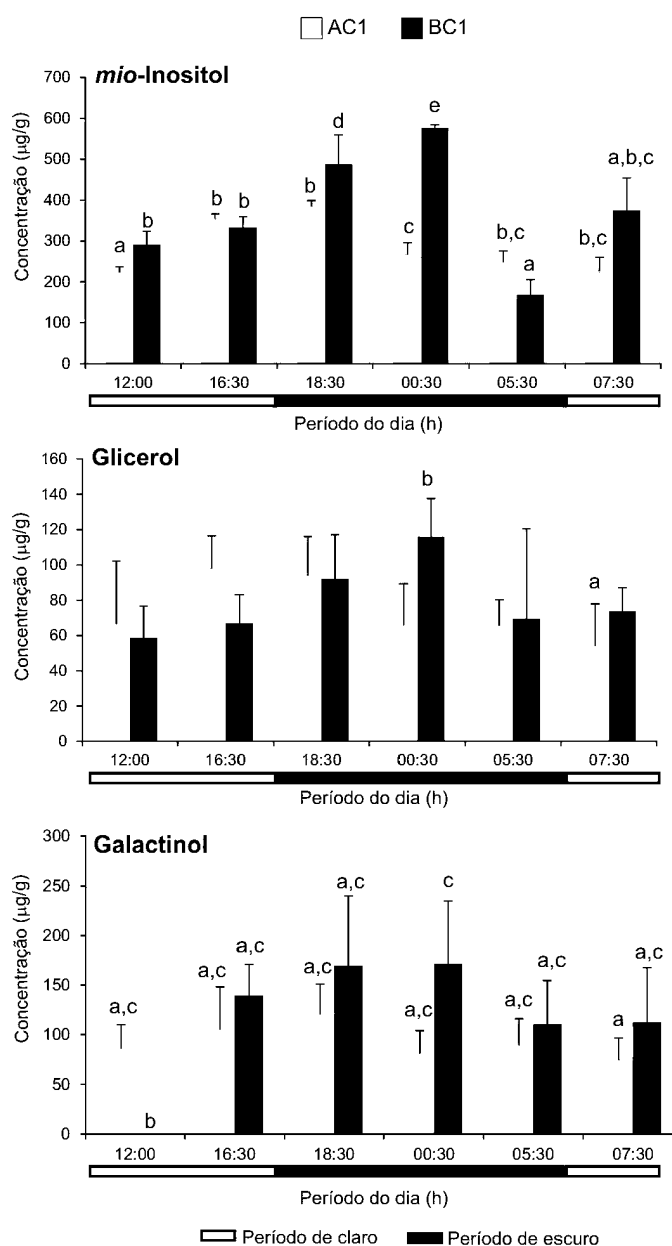
Nota: As letras referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$. Caracteres minúsculos destacam as diferenças entre os clones AC1 e BC1, e maiúsculos a diferença entre os períodos do dia.

FONTE: O autor (2018).

Do mesmo modo, os hidratos de açúcares glicerol (113), *mio*-inositol (115) e galactinol (124), apresentaram picos de produção quando a claridade é reduzida, embora sejam muito mais afetados pelo genótipo que os açúcares redutores (diferenças entre AC1 e BC1, Figura 29). Isso pode acontecer porque estes compostos são armazenados transitoriamente no vacúolo da planta e requeridos

quando existe uma homeostase negativa em relação ao estresse hídrico causado, por exemplo, pela evapotranspiração em períodos mais quentes do dia com maior intensidade da radiação solar. Em outras palavras, estes compostos são utilizados para proteção térmica de proteínas evitando a desidratação e consequente desnaturação destas (MOING, 2000).

FIGURA 29: HISTOGRAMA COMPARATIVOS DOS HIDRATOS DE AÇÚCARES *mio*-INOSITOL; GLICEROL E GALACTINOL, NOS DIFERENTES CLONES DE ERVA-MATE FRENTE À DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE



Nota: As letras referem-se as diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 observadas $p < 0,05$.

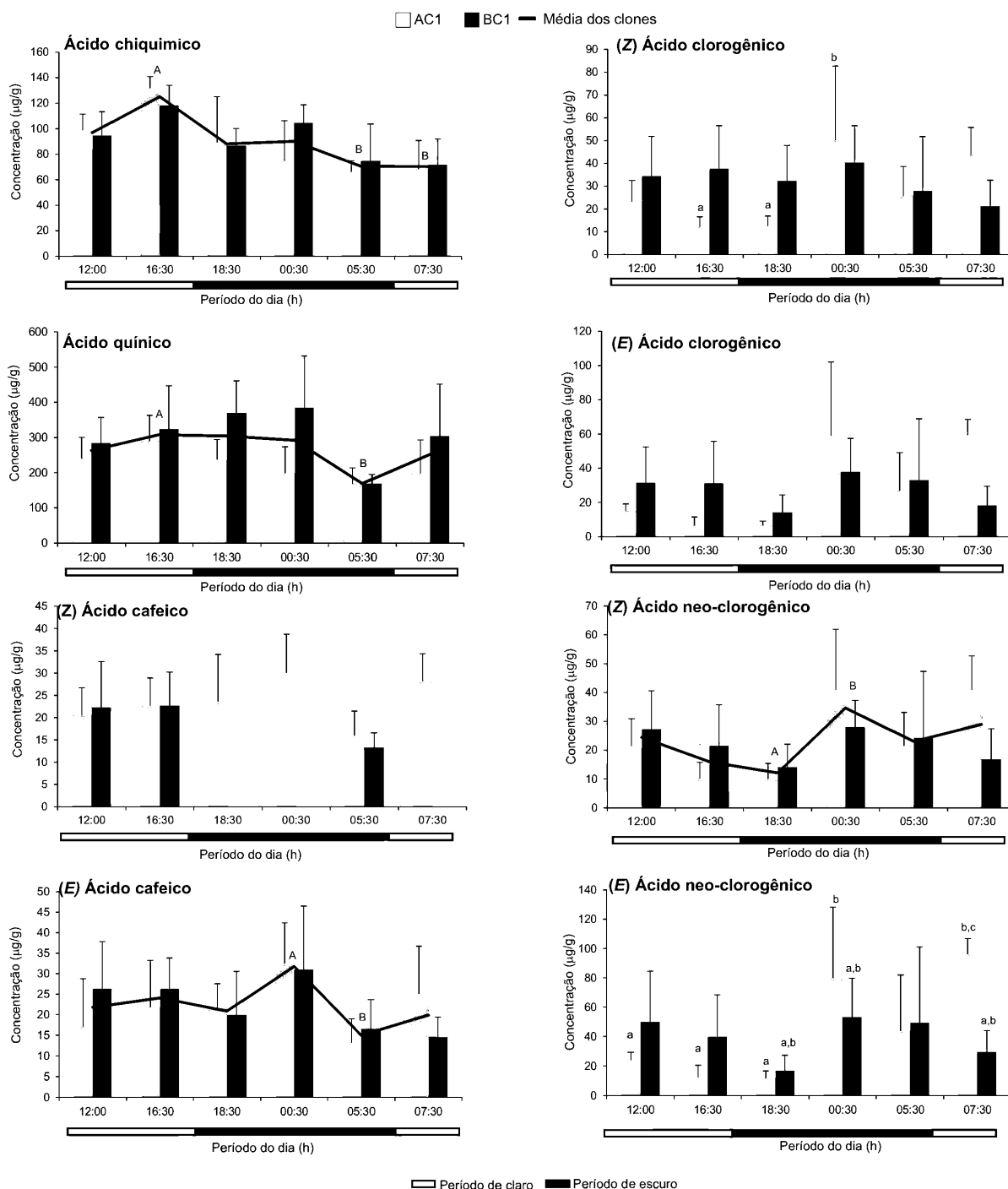
FONTE: O autor (2018)

Além do já exposto, o glicerol é importante fonte de carbono para formação de acetil-CoA, molécula basal na formação dos compostos requeridos no ciclo do ácido cítrico (e.g. formação de compostos fenólicos, terpenoides e ácidos graxos) (TAIZ; ZEIGER, 2013), os primeiros têm, entre outras, a função de proteger a planta frente a ataques de insetos e patógenos e proteção UV, o que também pode justificar seu consumo neste o período. Já os ácidos graxos são importantes fontes de armazenagem de carbono e são consumidos na ausência de luz, sendo sua diminuição um indício do seu uso quando da diminuição dos açúcares na manutenção do ciclo do ácido cítrico (Tabela 12, pág. 105).

Diferentemente do observado para os hidratos de açúcares, o ácido chiquímico (11), seus derivados (compostos 1, 2, 3, 4 e 5, Tabela 12), e o ácido quínico (141) sofrem de maneira oposta com a regulação rítmica, sendo que a sua produção é maximizada durante o dia (Tabela 12, Figuras 26 e 30). A produção de todos os compostos fenólicos (e.g. ácidos clorogênicos) e aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) são ajustados pela via do chiquimato (ALVES *et al.*, 1999; MAEDA; DUDAREVA, 2012). A produção de ácido chiquímico e ácido quínico deve, portanto, ser constante durante todo o período do dia, como o observado, as pequenas flutuações em período fotossintético são decorrentes da maior necessidade da planta em proteção dos tecidos, não só contra fatores bióticos, mas também contra os raios ultravioletas favorecendo assim, a síntese proteica de metabólitos secundários de proteção (*i.e.* produção de compostos fenólicos), durante esse período.

O ácido chiquímico é, ainda, um dos reguladores da formação do ácido quínico (141) e ácido cafeico (92 e 93), precursores dos compostos antioxidantes abundantes na erva-mate, os ácidos clorogênico, neo-clorogênico e cripto-clorogênico (FILIP *et al.*, 2001). Esses compostos, juntamente com o ácido cafeico, podem aparecer em duas configurações *Z* e *E* (Tabela 12, Figura 31), sendo que a forma *E* é preferencialmente produzida e utilizada pelos vegetais (SALUM *et al.*, 2015), com consumo destes compostos em período fotossintético do dia (Figura 20).

FIGURA 30: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS PERCURSORES E DOS ANTIOXIDANTES ESPECÍFICOS DE ERVA-MATE NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE



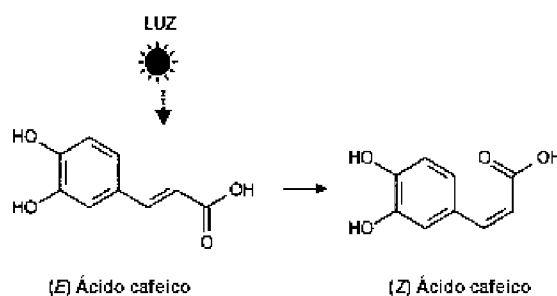
NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$. Caracteres minúsculos destacam as diferenças entre os clones AC1 e BC1, e maiúsculos a diferença entre os períodos do dia.

O autor (2018).

Os estereoisômeros Z são decorrentes da foto-isomerização do ácido cafeico (Figura 31), produzidos como resposta de defesa, para potencializar a atividade

antioxidante destes compostos evitando a danificação do tecido foliar. Os mecanismos pelos quais as plantas fazem essa isomerização ainda são passíveis de discussão (SALUM *et al.*, 2015).

FIGURA 31: REPRESENTAÇÃO DA FOTO-ISOMERIZAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO



Fonte: O autor (2018).

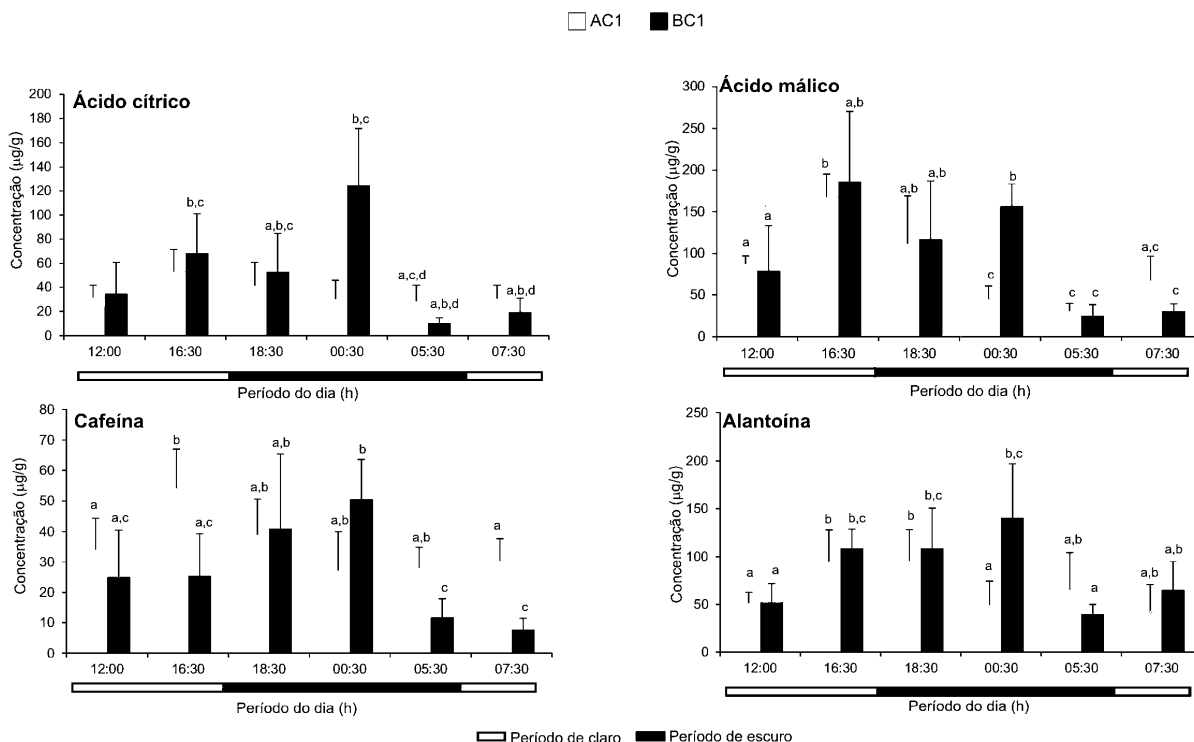
Nos resultados apresentados verificou-se que o ácido cafeico e seus derivados, anteriormente citados, são controlados pelos ritmos diurno/noturno e são dependentes do genoma (Figura 30), ou seja, os clones AC1 e BC1 apresentam de maneira distinta o ajuste destes compostos específicos (Tabela 12, Figuras 25 e 26), sendo que o isômero Z do ácido cafeico é produzido pelo clone AC1 ao longo do dia, já para o clone BC1 a produção deste composto é ausente nos períodos com menor luminosidade (18:30 e 00:30 h, Figura 30), quando não há atividade foto-oxidante para proteção de tecidos. Da mesma forma, os isômeros Z, dos ácidos clorogênico (95) e neo-clorogênico (98) (Figura 30), apresentaram maior concentração em período noturno, ou seja, são produzidos e, posteriormente, consumidos quando a ação da radiação solar é maior.

Diferentemente do que ocorre com os ácidos clorogênicos o flavonoide campferol, segundo a estatística apresentada (Tabela 12), não sofre mudanças na sua composição ao longo do dia, indicando que ele é um antioxidante de reserva, ou seja, só é utilizado quando há um fator externo extra (*e.g.* cortes, herbivoria; WAR *et al.*, 2012).

Os metabólitos, ácido cítrico (139), ácido málico (140) e cafeína (146) são fortemente coordenados pelo ritmo diurno/noturno, com pico de concentração em fotoperíodo com menor incidência de raios UV (antes do pôr do sol, 16 h 30 min) para o ácido málico (Figura 32). Já para a cafeína, é observado que, sua produção é associada ao genótipo (CARDOZO *et al.*, 2010), e para o clone AC1 ocorre aumento de sua concentração antes do pôr do sol, e para o clone BC1 após o pôr do sol

(Figura 32, Tabela 12), com diminuição da produção, para ambos os clones, com os primeiros estímulos luminosos do dia.

FIGURA 32: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO CÍTRICO; ÁCIDO MÁLICO; CAFEÍNA E ALANTOÍNA; NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE



NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 observadas $p < 0,05$.

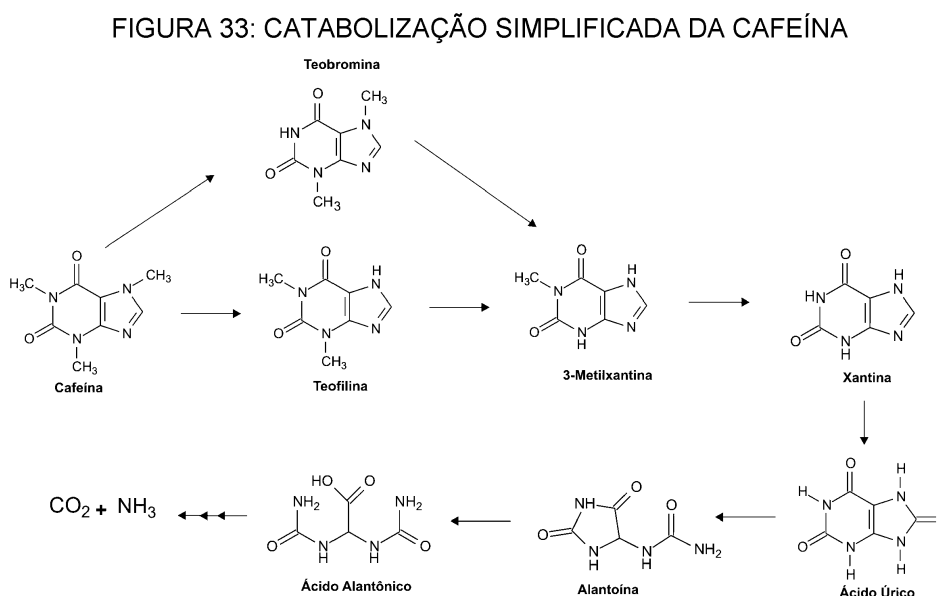
FONTE: O autor (2018)

Os ácidos cítrico e málico são os metabólitos base do ciclo do ácido cítrico e por isso devem ser produzidos durante todo o dia, coordenando a formação de diversos compostos, dentre os quais se destacam os aminoácidos aromáticos que serão utilizados para a síntese de flavonoides, hormônios, polifenóis, entre outros. Em fotoperíodo, o equilíbrio entre produção e consumo de compostos pode ser desequilibrado por fatores externos como temperatura e radiação solar (TAIZ; ZEIGER, 2013). Com maior incidência de radiação solar há maior ação dos raios UV, fator que leva a foto-oxidação de tecidos, e com isso uma maior produção e consumo de antioxidantes que são produzidos pelos compostos gerados no ciclo do ácido cítrico (ácido cítrico e ácido málico) (Figura 32), e da rota do ácido chiquímico (11), com produção maior em fotoperíodo, logo após pico de radiação solar (16:30 h) (Figura 32).

A acumulação de malato (ácido málico) durante o período de luz (Figura 32) foi anteriormente reportada em outras espécies, e pode estar relacionada com o fato do malato ser usado como contra-ânion de nitrato que é assimilado à noite, logo a produção de ácido málico diminui em escuro devido à rápida assimilação do nitrato (GIBON *et al.*, 2006).

A cafeína é produzida como resposta evolutiva, sendo que possui três funções principais para as plantas: i) proteção química contra predadores, já que cafeína é tóxica a muitos organismos; ii) agir como antioxidante e iii) ajudar a polinização do vegetal. Para muitos insetos, como as abelhas, e alguns pássaros, o a cafeína, que também pode ser produzida e transportada para as flores (néctar), atua como um incentivo, pois altera farmacologicamente as sinapses nervosas, e assim, esses polinizadores, lembram-se mais facilmente de plantas que contenham este metabólito (OESTREICH-JANZEN, 2016).

A cafeína é um alcaloide puridinico, não essencial para o funcionamento bioquímico da planta e, pode ser usada, assim como a alantoína (86), como fonte de nitrogênio, através da catabolização destas a CO_2 e NH_3 (Figura 33, ASHIRA; YOKOTA; CROZIER, 2013).



FONTE: Adaptado de Ashira; Yokota; Crozier (2013).

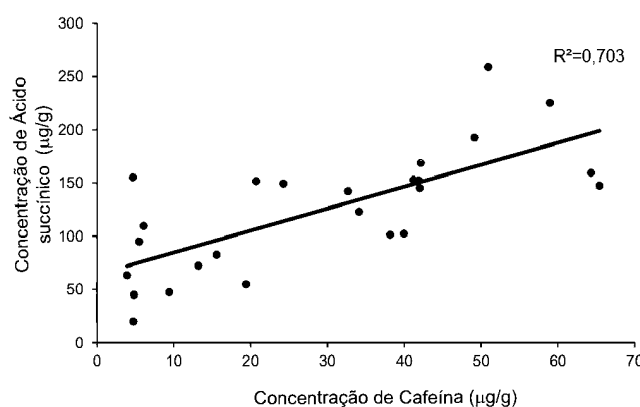
À noite a assimilação de nitrogênio é maximizada, mas logo após os primeiros estímulos luminosos, quando fotossíntese e a fixação de nitrogênio não ocorrem de forma eficiente, a planta pode ciclar compostos tanto da via do carbono quanto nitrogenados, não estruturais, para garantir a produção de compostos essenciais ao

seu funcionamento e manutenção do crescimento – com o aumento da fotossíntese há uma regulação dessa requisição. Essa hipótese é corroborada pela análise da Tabela 12, em que compostos da via de carbono não essenciais ao funcionamento básico da planta (*i.e.* ribitol (116), manose (132), glucopiranose (143), ácido treônico (112)) são consumidos no início do dia.

A alantoína pode, ainda, ser acumulada em plantas como resposta a várias condições de estresse, incluindo, escuridão prolongada, seca, estresse e alta irradiância, mas os motivos pelos quais a planta utiliza deste recurso ainda são desconhecidos (IRANI; TODD, 2018). A acumulação de alantoína se apresentou de forma diferente para os clones testados, embora a concentração verificada em período fotossintético ativo, em que a radiação solar é maior, tenha sido significativamente maior, ainda para o clone BC1 o acúmulo deste metabólito foi superior à noite (Figura 32). As diferenças entre as respostas à quantidade de alantoína encontrada para os clones AC1 e BC1 estão relacionadas ao genótipo, e por esse composto estar intimamente ligado com a síntese, e posterior catabolização da cafeína e outras xantinas (Figura 33), assim o acúmulo de cafeína resultará em maior concentração de alantoína (Figura 32).

O mesmo raciocínio deve ser usado para o ácido succínico (12) que é um regulador da rota da SAM (S-adenosil-metionina (ASHIRA; OGITA; CROZIER, 2001), principal rota para obtenção de cafeína e seus derivados, assim menores concentrações de cafeína envolvem, via de regra, menores quantidades de ácido succínico, sendo esse efeito mais pronunciado para o clone BC1 (Tabela 12, Figura 34).

FIGURA 34: CORRELAÇÃO ENTRE OS METABÓLITOS CAFEÍNA E ÁCIDO SUCCÍNICO PARA CLONE BC1 FRENTE A DIFERENÇAS DE LUMINOSIDADE



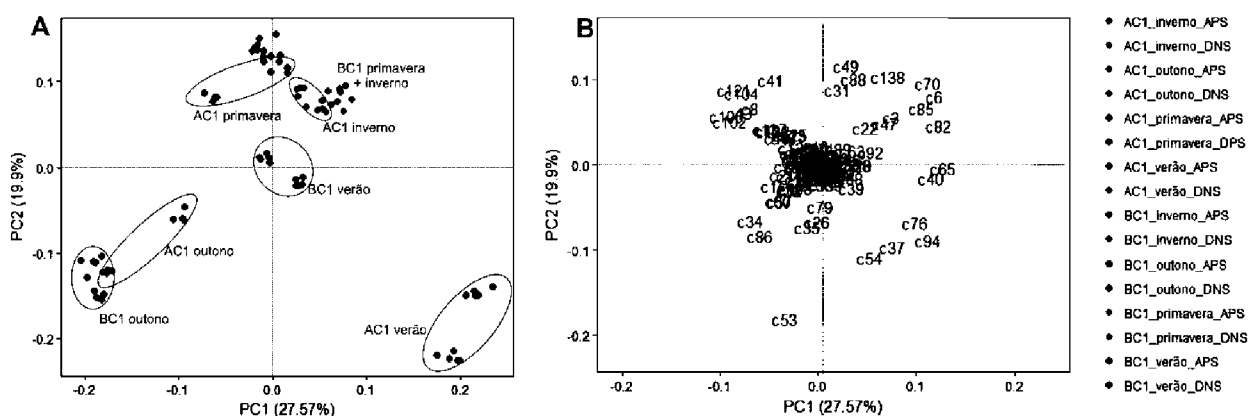
FONTE: O autor (2018)

4.2 SAZONALIDADE NA DISTINTIÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE

A sazonalidade é uma condição ambiental fenológica que pode modificar o fenótipo nos vegetais, assim, para melhor entender os mecanismos que influenciam na distribuição de metabólitos em erva-mate, foram feitas análises de tecido vegetal foliar nas diferentes estações do ano.

As análises possibilitaram a detecção de 140 metabólitos monitorados por CG-EM, 50% destes identificados (vide Apêndice C), com perfil de uma fração polar enriquecida para metabólitos primários e pequena quantidade de secundários (Tabela 13). Inicialmente os dados foram transformados usando CLR e sujeitos à análise de componentes principais (Figura 35).

FIGURA 35: SCORES (A) DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS DE FOLHAS ADULTAS DOS CLONES AC1 E BC1 DE ERVA-MATE COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, EM DOIS HORÁRIOS DO DIA DEPOIS DO NASCER DO SOL (DNS) E ANTES DO PÔR DO SOL (ANS). LOADINGS DOS COMPOSTOS (B). A IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PODE SER VISUALIZADA NA TABELA 13



FONTE: O autor (2018).

TABELA 13: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS CLONES AC1 E BC1 DURANTE ANÁLISE SAZONAL

(Continua)

ID	MPIMP-ID	IR Nome	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	Concentração (µg/g)							
					□ AC1 ■ BC1							
					outono		inverno		primavera		verão	
					média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)
1	A000489-101	1793,93	Ácido benzóico 1,4-dicarboxílico ^{INT}	2 TMS	221 251 296	ND ^a 100,67 ^b	301,00	ND ^a ND ^a	53,98 ^b ND ^a	116,59	ND ^a ND ^a	
3	A183004-101	1812,68	Ácido benzóico 3,4-dicarboxílico ^{INT}	3 TMS	194 311 370	127,50 ^a ND ^b	29,42	142,39 ^a 140,26 ^a	32,37 35,23	147,83 ^a 110,45 ^a	18,24 15,26	127,32 ^a 94,80 ^a 22,31
6	A098003-101	971,63	Ácido bórico ^{INT}	3 TMS	205 221 263	ND ^a ND ^a		79,43 ^{b,c,d} 76,49 ^{b,c,d}	49,65 43,53	84,33 ^{b,c} 90,01 ^{b,c}	50,55 7,23	111,29 ^c 50,91 ^d 22,56
8	A158004-101	1572,85	2-oxo-Ácido glutárico ^{INT}	1 MEOX 2 TMS	186 147 198	18,71 ^{a,c} 33,87 ^c	31,04 74,22	11,07 ^a 26,83 ^{a,c}	28,11 73,35	21,28 ^{a,c} 31,01 ^{a,c}	42,57 67,42	ND ^b 13,23 ^a 44,45
11	A181002-101	1794,63	Ácido chiquimico ^{INT}	4 TMS	204 255 190	102,24 ^a 97,61 ^{a,b}	37,94 27,28	84,27 ^{a,b} 81,84 ^{a,b}	21,51 33,19	121,03 ^a 51,42 ^{c,d}	41,56 21,58	23,66 ^{c,d} 52,45 ^{c,d} 14,95
13	A115003-101	1152,05	Álcool benzílico ^{INT}	1 TMS	165 136 166	83,22 ^a 122,96 ^{a,b}	27,50 70,43	94,71 ^a 116,07 ^{a,b}	25,44 38,66	135,85 ^b 83,89 ^{a,b}	30,18 14,27	102,25 ^{a,b} 70,28 ^{a,c} 12,73
16	A225002-101	2243,49	Ácido octadecanóico ^{INT}	1 TMS	118 98 84	78,57 ^a 160,71 ^d	30,91 110,20	99,98 ^{a,b,c} 113,05 ^{a,b,c,d}	17,10 28,53	118,47 ^{a,b,c,d} 110,85 ^{a,b,c,d}	18,12 2,36	141,33 ^{b,c,d} 114,51 ^{a,b,c,d} 23,67
86	A209001-101	2068,66	Alantoina ^{INT}	3 TMS	116 101 173	73,91 ^a 87,81 ^a	56,62 44,76	9,04 ^{b,d} 29,75 ^d	121,00 13,44	ND ^c ND ^c		14,75 ^{b,d} 20,22 ^{b,d} 113,88 112,51
90	A191004-101	1913,02	Tiramina ^{INT}	3 TMS	175 338 250	24,49 ^{a,d} 56,07 ^b	44,26 151,29	26,70 ^{a,d} 82,44 ^{b,c}	26,72 229,13	66,40 ^b 84,62 ^c	36,86 14,73	15,61 ^{a,d} 23,99 ^d 32,96 3,92
92	A199001-101	1977,47	(Z) Ácido cafeico ^{INT}	3 TMS	220 396 219	25,10 ^a 12,64 ^a	21,66 49,11	68,67 ^b 57,47 ^b	32,04 41,74	67,42 ^b 72,02 ^b	31,82 74,82	139,18 ^c 74,11 ^b 34,70 43,15
94	A210001-101	2097,85	(E) Ácido ferúlico ^{INT}	2 TMS	249 308 338	ND ^a ND ^a		ND ^a 83,30 ^c	119,57	ND ^a ND		194,69 ^b 77,44 ^c 20,67 113,18
97	A317001-101	3154,54	(E) Ácido-4-cafeiolquinico ^{INT}	6 TMS	373 484 447	26,91 ^{a,b,c} 20,37 ^{a,c,d}	81,09 47,54	25,06 ^{a,c,d} 42,33 ^{a,b,c}	54,14 18,99	32,85 ^{a,b,c,d} 43,72 ^{a,b,c,d}	54,12 91,69	74,17 ^b 29,22 ^{a,c,d} 46,25 45,90
100	A232002-101	2292,48	Frutose-6-Fosfato ^{INT}	1 MEOX 6 TMS	315 299 316	109,12 ^a 96,88 ^{a,b}	38,20 23,58	23,32 ^{a,b,c,d} 51,86 ^{a,b,d,e}	119,41 115,96	71,65 ^b 55,52 ^{d,e}	18,94 27,92	ND ^c 33,87 ^e 33,18
101	A233002-101	2307,34	Glicose-6-Fosfato ^{INT}	1 MEOX 6 TMS	89 103 129	87,50 ^a 92,00 ^a	38,43 32,14	35,74 ^b 37,99 ^{b,c}	26,05 44,37	56,48 ^c 51,38 ^c	15,95 26,65	12,59 ^{b,c} 31,03 ^b 115,91 18,66
102	A129001-101	1261,98	Ácido glicérico-3-fosfato ^{INT}	4 TMS	299 357 227	56,74 ^a 52,99 ^a	48,71 43,07	31,69 ^a 26,42 ^c	26,76 33,89	48,16 ^a 17,89 ^{a,c}	44,98 44,93	ND ^b 18,98 ^c 14,60
103	A119001-101	1165,67	Ácido fosfórico ^{INT}	3 TMS	299 193 283	88,21 ^{a,c} 77,17 ^{a,c}	69,93 31,13	47,07 ^{a,b} 58,60 ^{a,b}	34,85 32,21	50,90 ^{a,b} 59,26 ^{a,b,c}	27,60 42,18	35,68 ^{a,b} 28,03 ^b 91,21 16,11
104	A154001-101	1528,59	Ácido fosfórico monometil éster ^{INT}	2 TMS	163 211 243	72,78 ^{a,c} 69,29 ^a	73,78 42,40	76,87 ^a 74,07 ^a	20,82 42,65	98,59 ^a 75,37 ^a	52,77 39,69	ND ^b 26,87 ^c 9,97
106	A204001-101	2030,47	Ácido galactárico ^{INT}	6 TMS	143 189 334	38,40 ^a 58,49 ^{b,c}	33,94 45,36	38,27 ^a 60,94 ^c	28,93 7,82	28,76 ^{a,b} 30,53 ^{a,b}	43,80 43,35	65,98 ^{b,c} 14,70 ^d 25,77 8,67

(Continua)

ID	MPIMP-ID	IR Nome	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	Concentração (µg/g)							
					□ AC1 ■ BC1							
					outono		inverno		primavera		verão	
					média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)
107	A199002-101	1980,49	Ácido galactônico ^{INT}	6 TMS 103 129 204	64,91 ^a 100,73 ^c	43,17 41,66	51,21 ^a 76,67 ^{a,b}	28,39 3,53	62,35 ^{a,b} 39,98 ^{a,d}	28,71 17,82	88,76 ^b 47,21 ^{a,d}	24,59 15,64
108	A200001-101	1984,52	Ácido glucônico ^{INT}	6 TMS 319 189 319	ND ^a 4,75 ^b		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a	
109	A135003-101	1319,94	Ácido glicérico ^{INT}	3 TMS 292 189 130	88,06 ^a 92,29 ^a	29,34 62,16	39,51 ^b 39,42 ^{b,c}	46,48 4,92	73,24 ^a 44,23 ^c	30,09 3,29	21,92 ^b 79,34 ^a	56,11 8,53
110	A177001-101	1751,51	Ácido ribônico ^{INT}	5 TMS 292 333 293	58,44 ^a 66,88 ^a	37,37 34,66	64,61 ^a 68,48 ^a	25,88 24,57	40,10 ^{a,b} 28,33 ^b	34,50 2,99	33,43 ^b 43,53 ^{a,b}	27,76 12,49
111	A201001-101	2000,79	Ácido sacárico ^{INT}	6 TMS 333 143 189	44,19 ^{a,b,c} 61,91 ^b	22,86 53,83	48,34 ^{a,b} 87,96 ^{a,b,c}	19,52 77,43	46,38 ^{a,b,c} 62,72 ^{a,b,c}	80,51 57,83	67,95 ^{a,b} 38,37 ^c	18,88 23,70
112	A156001-101	1545,94	Ácido treônico ^{INT}	4 TMS 217 294 189	48,94 ^a 67,29 ^c	58,00 87,64	25,09 ^b 52,43 ^{a,c}	26,95 52,15	30,07 ^b 26,27 ^b	64,97 4,64	63,31 ^c 37,95 ^{a,b}	30,10 75,67
115	A209002-101	2080,20	<i>mio</i> - Inositol ^{INT}	6 TMS 217 318 432	140,49 ^a 161,71 ^a	32,28 37,35	102,15 ^b 117,96 ^b	21,28 3,78	92,51 ^b 83,62 ^b	26,63 11,74	102,12 ^b 67,49 ^c	16,73 9,37
125	A167002-101	1650,62	Arabinose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS 217 189 205	16,53 ^{a,c} 40,36 ^{a,c}	77,55 259,56	28,67 ^a 34,58 ^a	54,47 11,68	30,94 ^a 14,76 ^c	45,58 15,82	1,11 ^b 9,30 ^c	31,46 15,90
126	A187002-101	1853,93	Frutose ^{INT}	1 MEOX 5 TMS 217 307 191	18,00 ^{a,b,c} 17,38 ^{a,c}	83,57 49,96	12,84 ^{a,b,c} 13,44 ^{a,b,c}	65,87 83,36	26,95 ^{a,c} 23,06 ^{a,b,c}	53,17 77,28	4,90 ^b 16,65 ^{a,c}	49,96 74,44
127	A173002-101	1714,66	Fucose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS 117 160 277	70,70 ^{a,b} 82,65 ^{a,c}	32,54 42,64	70,74 ^{a,b} 80,58 ^{a,c}	32,07 45,73	88,99 ^a 63,72 ^{a,c}	40,13 16,43	20,06 ^b 44,28 ^c	105,56 12,42
128	A188001-101	1876,07	Galactose ^{INT}	1 MEOX 5 TMS 205 217 157	58,41 ^a 67,31 ^{a,b}	38,17 57,43	79,20 ^{a,b} 74,64 ^{a,b}	44,06 6,44	46,87 ^a 21,68 ^b	39,11 13,97	11,80 ^b 27,64 ^{c,d}	70,97 7,12
130	A172001-101	1701,20	β-Glicose-1,6-anidro ^{INT}	3 TMS 204 217 143	66,59 ^{a,c} 86,98 ^b	21,28 37,04	67,35 ^{a,c} 88,11 ^b	33,67 44,24	60,43 ^a 55,65 ^{a,c}	21,00 29,14	86,39 ^b 45,71 ^c	17,59 16,83
132	A274001-101	2719,80	Manose ^{INT}	1 MEOX 5 TMS 205 319 160	48,44 ^a 45,40 ^a	34,15 54,07	55,63 ^a 50,60 ^a	39,23 58,90	56,14 ^a 29,57 ^c	56,65 19,29	6,21 ^b 25,43 ^c	154,43 8,68
134	A168002-101	1665,99	Ribose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS 217 307 191	117,66 ^{a,b} 148,17 ^a	53,52 48,92	79,07 ^b 91,20 ^{a,b}	67,27 51,83	119,05 ^{a,b} 64,97 ^b	35,09 22,94	26,13 ^c 81,91 ^b	57,46 16,24
137	A165001-101	1645,84	Xilose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS 217 189 307	99,88 ^{a,b} 76,37 ^a	27,81 27,99	102,37 ^{a,b} 77,95 ^a	48,04 45,99	126,64 ^b 77,39 ^a	36,32 35,51	10,08 ^c 122,10 ^b	117,17 29,96
138	A363001-101	3649,15	Ácido ursólico ^{INT}	2 TMS 133 189 320	ND ^a ND ^a		23,54 ^b 17,65 ^{b,c}	50,61 24,26	28,02 ^{b,c} 19,16 ^b	103,14 18,82	13,49 ^{b,c} 11,65 ^c	201,08 15,63
139	A182004-101	1803,92	Ácido cítrico ^{INT}	4 TMS 273 211 465	45,51 ^{a,b} 45,47 ^{a,b,c}	41,50 75,27	38,92 ^{a,c} 47,35 ^{a,b,c}	30,96 61,67	18,91 ^{a,b,c} 12,78 ^c	75,48 35,33	69,34 ^b 12,75 ^c	34,11 16,12
141	A185001-101	1842,69	Ácido quínico ^{INT}	5 TMS 255 191 204	259,49 ^a 315,96 ^a	37,17 45,41	69,27 ^b 76,40 ^b	16,29 34,99	77,32 ^b 49,91 ^c	24,34 2,15	39,07 ^c 50,39 ^c	28,84 1,62

(Continua)

										Concentração (µg/g)					
										□ AC1		■ BC1			
ID	MPIMP-ID	IR Nome	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	outono		inverno		primavera		verão				
					média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)			
142	A177004-101	1755,75	Glucopiranosse [-H ₂ O] ^{INT}	4 TMS	217	191	233	33,03 ^a	35,60	68,17 ^b	52,40	45,52 ^{a,b}	37,91	134,33 ^c	39,10
								33,63 ^a	29,87	57,70 ^b	45,11	48,82 ^{a,b}	6,45	35,82 ^a	14,68
144	A189002-101	1880,50	Glicose ^{INT}	1 MEOX 5 TMS	204	130	117	233,55 ^a	46,11	79,37 ^b	18,51	86,34 ^b	21,89	21,84 ^c	56,54
								210,49 ^a	71,44	65,66 ^{b,d}	45,64	55,73 ^d	25,93	52,59 ^d	15,08
143	A198006-101	1959,24	Glucopiranosse ^{INT}	5 TMS	204	191	233	3,44 ^{a,b}	64,90	3,56 ^{a,b}	67,61	3,85 ^{a,b}	28,09	1,62 ^a	65,05
								3,30 ^{a,b}	65,56	3,15 ^{a,b}	59,96	3,95 ^{a,b}	74,76	6,42 ^b	133,85
145	A264001-101	2623,04	Sacarose ^{INT}	8 TMS	217	271	361	312,22 ^a	36,60	90,64 ^b	18,57	97,75 ^b	16,36	83,59 ^b	19,81
								334,80 ^a	37,32	99,12 ^b	34,51	78,51 ^b	1,27	65,98 ^c	12,77
146	A185011-101	1878,67	Cafeína ^{INT}		194	109	82	40,47 ^a	33,75	62,15 ^b	22,81	74,45 ^b	25,74	124,74 ^c	31,41
								17,08 ^d	32,83	49,08 ^a	33,87	126,62 ^{b,c}	59,63	47,20 ^a	11,36
2	A128003-101	1250,39	Ácido benzóico ^{EST}	1 TMS	105	135	179	65,81 ^A	26,21	85,67 ^B	39,80	96,28 ^B	28,75	64,64 ^A	20,68
								75,81 ^A	33,10	82,27 ^B	36,78	87,04 ^B	24,95	53,33 ^A	29,77
4	A158007-101	1568,99	Ácido benzóico 3-hidroxi ^{EST}	2 TMS	267	193	223	112,89 ^A	33,56	185,60 ^B	40,93	144,27 ^{A,B}	63,05	129,27 ^{A,B}	35,24
								87,03 ^A	58,72	159,45 ^B	54,49	123,10 ^{A,B}	51,87	138,81 ^{A,B}	28,43
5	A164003-101	1633,29	Ácido benzóico 4-hidroxi ^{EST}	2 TMS	193	267	223	82,44 ^A	48,08	172,61 ^B	46,77	130,40 ^B	62,53	118,23 ^B	42,53
								70,09 ^A	56,32	139,39 ^B	55,36	113,47 ^B	57,29	118,08 ^B	38,07
7	A137001-101	1346,94	Ácido fumárico ^{EST}	2 TMS	245	147	83	64,76 ^A	54,82	32,42 ^B	25,33	63,97 ^A	62,86	54,55 ^{A,B}	99,37
								66,64 ^A	75,07	31,72 ^B	40,44	44,85 ^A	37,99	114,00 ^{A,B}	52,13
9	A105001-101	1044,47	Ácido láctico ^{EST}	2 TMS	117	191	147	18,28 ^A	54,16	57,69 ^B	151,90	30,74 ^{B,C}	38,36	27,35 ^{A,C}	41,72
								14,89 ^A	26,27	55,72 ^B	61,00	28,37 ^{B,C}	33,08	23,15 ^{A,C}	50,73
10	A113002-101	1118,32	Ácido oxálico ^{EST}	2 TMS	147	133	190	23,73 ^A	75,19	72,25 ^{A,B}	211,13	89,05 ^B	34,84	23,28 ^A	76,48
								43,22 ^A	60,76	58,37 ^{A,B}	61,28	86,92 ^B	75,54	34,27 ^A	80,75
12	A134001-101	1310,65	Ácido succínico ^{EST}	2 TMS	247	172	150	78,01 ^A	55,49	51,06 ^{A,B}	38,90	58,46 ^{A,B}	36,62	42,90 ^B	41,01
								94,82 ^A	67,21	72,92 ^{A,B}	46,59	59,03 ^{A,B}	26,85	37,66 ^B	24,50
15	A205001-101	2045,44	Ácido hexadecanóico ^{EST}	1 TMS	117	131	313	92,50 ^A	29,06	119,67 ^{A,B}	15,96	138,10 ^B	21,15	115,51 ^{A,B}	14,61
								92,45 ^A	16,32	130,97 ^{A,B}	24,71	131,70 ^B	20,44	94,64 ^{A,B}	20,65
17	A306002-101	3077,52	Campferol ^{EST}	5 TMS	559	133	560	52,91 ^A	14,68	51,18 ^A	27,17	83,03 ^B	22,26	33,03 ^C	31,90
								63,63 ^A	30,47	65,86 ^A	38,70	75,84 ^B	40,30	38,74 ^C	21,77
87	A128002-101	1259,94	Etanolamina ^{EST}	3 TMS	100	86	174	60,43 ^A	42,25	69,47 ^{A,B}	30,61	100,24 ^B	24,01	66,58 ^A	13,08
								57,72 ^A	21,99	80,54 ^{A,B}	32,09	81,96 ^B	22,88	52,14 ^A	25,56
93	A214001-101	2135,55	(E) Ácido cafeico ^{EST}	3 TMS	219	382	397	23,63 ^A	37,32	131,43 ^B	81,98	162,19 ^B	38,59	88,84 ^C	39,16
								27,14 ^A	24,83	127,32 ^B	72,12	101,57 ^B	48,17	84,12 ^C	64,90
95	A299001-101	2981,68	(Z) Ácido-3-cafeiolquinico ^{EST}	6 TMS	345	256	219	23,73 ^A	51,99	90,26 ^B	42,84	82,18 ^B	60,26	140,20 ^C	33,98
								21,13 ^A	40,88	77,84 ^B	68,67	93,46 ^B	45,39	104,89 ^C	30,59
96	A311001-101	3099,59	(E) Ácido-3-cafeiolquinico ^{NS}	6 TMS	345	256	307	27,34	70,74	27,02	40,11	48,64	49,98	42,51	35,27
								31,08	55,51	39,24	77,18	43,36	42,39	44,46	36,82

(Conclusão)												
Concentração (µg/g)												
□ AC1 ■ BC1												
ID	MPIMP-ID	IR Nome	Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)	outono		inverno		primavera		verão	
					média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)
98	A301002-101	2988,16 (Z) Ácido-5-cafeiolquínico ^{EST}	6 TMS	307 345 147	32,24 ^A 26,31 ^A	93,13 74,80	29,23 ^{A,B} 54,83 ^{A,B}	47,38 84,83	48,90 ^B 47,04 ^B	57,74 54,90	42,78 ^B 46,27 ^B	41,95 38,10
99	A319001-101	3177,08 (E) Ácido-5-cafeiolquínico ^{NS}	6 TMS	255 357 447	52,80 36,09	89,08 40,67	42,10 65,38	57,27 16,54	64,99 60,60	45,05 49,53	62,18 52,67	30,96 37,68
105	A154001-101	1528,59 Ácido eritrônico ^{EST}	4 TMS	217 205 292	24,87 ^A 19,49 ^A	77,18 62,49	22,67 ^A 28,45 ^A	29,46 77,45	37,50 ^{A,B} 36,73 ^{A,B}	56,42 61,61	45,83 ^B 35,89 ^B	38,27 42,98
113	A129003-101	1262,29 Glicerol ^{EST}	3 TMS	205 217 129	75,64 ^A 83,95 ^A	41,01 33,51	68,65 ^A 78,99 ^A	33,91 42,39	45,65 ^B 34,74 ^B	53,24 23,68	48,69 ^B 52,85 ^B	30,57 15,90
114	A140012-101	1401,60 Hidroquinona ^{EST}	2 TMS	254 239 112	79,56 ^A 68,70 ^A	40,46 20,64	103,45 ^B 118,02 ^B	84,43 33,41	131,60 ^B 114,04 ^B	27,22 25,66	57,42 ^A 44,71 ^A	20,99 16,89
116	A173001-101	1712,74 Ribitol ^{EST}	5 TMS	205 217 319	118,33 ^A 115,81 ^A	46,16 40,05	126,63 ^{A,B} 147,40 ^{A,B}	49,91 53,71	168,09 ^B 147,42 ^B	36,78 25,19	153,09 ^{A,B} 112,33 ^{A,B}	19,41 31,77
122	A127003-101	1236,16 Dietilenoglicol ^{NS}	2 TMS	117 145 131	77,97 74,95	43,43 16,81	45,54 58,51	25,83 36,05	61,10 53,73	44,65 32,16	52,74 42,23	29,42 36,89
124	A299002-101	2966,29 Galactinol ^{EST}	9 TMS	204 217 191	73,25 ^A 74,04 ^A	25,52 22,35	95,25 ^B 90,22 ^B	64,25 58,70	105,21 ^B 86,19 ^B	48,23 47,38	83,13 ^{A,B} 64,08 ^{A,B}	52,43 48,96
131	A274001-101	2719,80 Maltose ^{EST}	1 MEOX 8 TMS	319 205 361	41,00 ^A 50,78 ^A	23,32 32,37	39,64 ^{B,C} 36,63 ^{B,C}	71,62 53,83	53,65 ^A 40,47 ^A	61,47 46,74	22,37 ^C 18,06 ^C	54,79 22,68
133	A337002-101	3350,64 Rafinose ^{EST}	11 TMS	205 217 191	52,61 ^A 49,95 ^A	25,75 47,01	49,54 ^A 40,55 ^A	83,69 66,98	140,20 ^B 98,15 ^B	68,70 93,17	49,29 ^A 39,16 ^A	42,77 67,78
135	A166012-101	1665,98 Ribulose ^{EST}	1 MEOX 4 TMS	217 307 191	48,97 ^A 52,22 ^A	42,19 28,62	43,96 ^A 48,25 ^A	201,91 54,37	28,63 ^{A,B} 22,88 ^{A,B}	81,04 71,27	15,03 ^B 20,41 ^B	79,35 69,50
140	A149001-101	1479,34 Ácido málico ^{EST}	3 TMS	233 189 147	123,54 ^A 116,43 ^A	50,91 87,73	66,88 ^B 61,87 ^B	16,45 59,47	95,13 ^{A,B} 87,82 ^{A,B}	70,09 37,10	131,25 ^{A,B} 61,12 ^{A,B}	58,82 55,89

Nota: ND compostos não detectados. Letras subscritas referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$ com interação (INT) existente entre clones e estação do ano, sem interação (EST), ou seja, com diferenças existentes apenas entre a estação do ano e não entre clones, NS análise estatística não significativa. As diferenças entre os clones AC1 (em branco) e BC1 (em cinza) são apresentadas entre as linhas da tabela. Para os açúcares redutores foi considerado apenas o maior pico encontrado, via de regra o isômero E.

A PCA explica 45 % da variação entre as amostras com dois componentes principais. Primeiramente, observa-se que o efeito da sazonalidade foi mais importante que o efeito da coleta no mesmo dia, ou seja, as amostras coletadas no mesmo dia para uma dada estação apresentam menor variação quando comparada a outra estação. O genótipo (diferentes clones) foi importante para a separação das amostras, principalmente para estação de verão. Em PC1 e PC2 negativos ocorre a separação das amostras coletadas no outono das demais. Já em PC1 positivo e PC2 negativo tem a proximidade das estações primavera e inverno para ambos os clones.

Os compostos ácido benzóico 3,4 dicarboxílico (3), ácido bórico (6), 2-oxo-ácido glutárico (8), alantoína (86), *E*-ácido ferúlico (94), frutose-6-fosfato (100), ácido glicérico 3- fosfato (102), ácido fosfórico (104) e ácido ursólico (138) foram os que mais influenciaram a distribuição dos dados, pois não foram detectados em todas estações e/ou clones analisados. Já com relação aos não identificados os metabólitos 22, 26, 31, 34, 35, 37, 40, 41, 43, 49, 47, 53, 54, 65, 76, 79, 82, 85 e 121 foram os que mais influenciaram o agrupamento entre as amostras, sendo que esta influência está relacionada com aqueles compostos presentes e ausentes entre as estações e clones.

A Tabela 13 mostra os compostos identificados, dos quais, é possível ver que os açúcares possuem maior abundância em relação aos demais compostos. Sendo a sacarose (145) em outono significativamente maior ($p < 0,05$) que nas demais estações. O mesmo é observado para a glicose (144). Os compostos com coeficiente de variação (CV) acima de 70 % são os mais afetados pela regulação dos relógios circadianos, como já discutido anteriormente.

Pode ser observado, ainda, na Tabela 13, que existe forte influência do material genético nas análises sazonais (relação INT), sendo que alguns compostos, dependendo do clone, sofrem acréscimo em determinada estação e diminuição em outra. Como no caso da cafeína (146), que para o clone AC1 tem produção maximizada em verão e para BC1 na primavera.

Entre os compostos antioxidantes da erva-mate o ácido clorogênico (99) e neo-clorogênico (96), têm sua produção ampliada durante o verão. Já o *E*-ácido cafeico (93), apresenta maior concentração no inverno e seu estereoisômero *Z* (92) no verão, sendo que estes, com exceção do ácido clorogênico, não tiveram

interação com relação ao material genético, ou seja, a diferença está fortemente associada às estações e não aos clones.

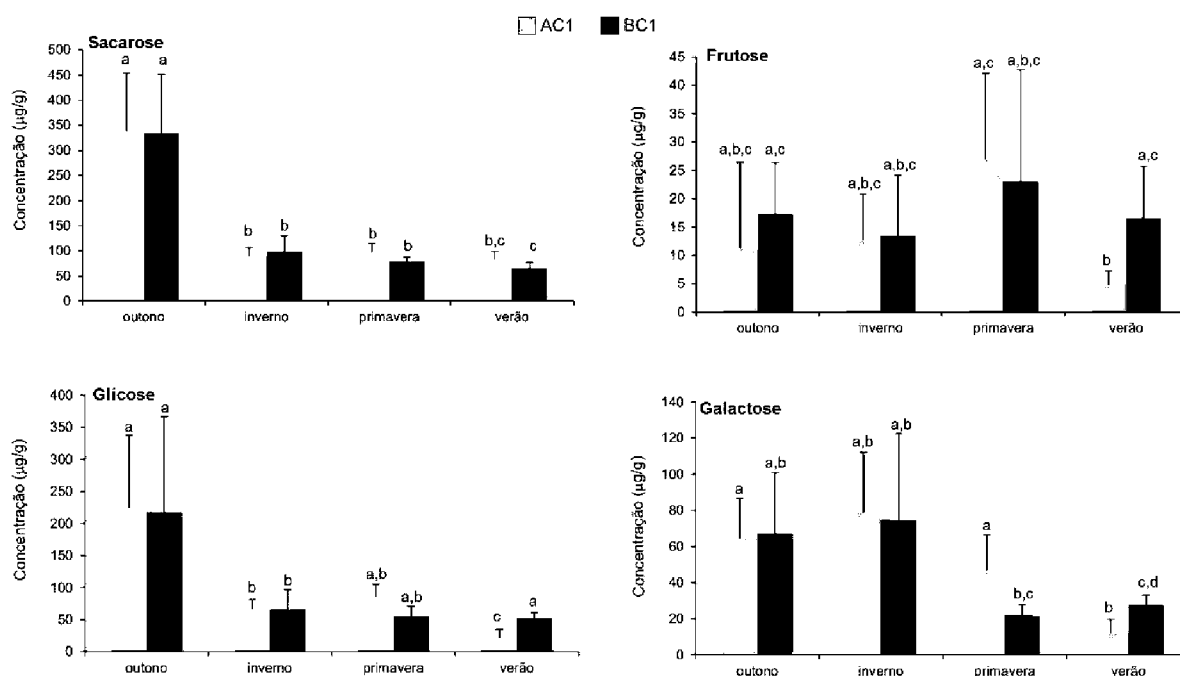
A maioria dos açúcares encontrados apresenta maior concentração na estação de outono e menor no verão. O contrário é visto para os hidratos de açúcar *mio*-Inositol (115) e gactinol (124), com o decréscimo da concentração na estação mais quente.

O ácido chiquímico (11) expressou aumento, significativo, em sua concentração no outono e primavera para o clone AC1 e, apenas em outono para BC1. O flavonoide campferol (17) apresentou pequena variação para as estações de primavera e verão.

A sazonalidade está diretamente relacionada com mudanças na temperatura e no período fotossintético, com dias mais longos e quentes no verão. Embora a luz seja o recurso energético fundamental para as plantas, impulsionando o crescimento, a alta incidência solar pode limitar o desempenho destas, principalmente no metabolismo de carboidratos (MARTINS *et al.*, 2014). Isto porque, a maior amplitude de taxas fotossintéticas diminui a requisição de sacarose para armazenamento de amido, usado como reserva de carbono, e estimulam a sua rápida transformação e transporte como açúcares redutores (glicose e frutose) para serem usadas na sustentação e crescimento. Por isso, as plantas têm crescimento maior no verão, já que o processo produtor consumidor é mais eficiente não havendo a necessidade de acúmulo de açúcares (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em contra partida, em dias mais frios, e curtos, a necessidade de armazenamento energético, para que não aja comprometimento das funções metabólicas, principalmente às relacionadas com o transporte de nutrientes e energia, protegendo o protoplasma e membranas do frio, o que faz com que a sacarose seja utilizada tanto para os processos basais da planta, como armazenamento de amido (MAGEL; EINIG; HAMPP, 2000), evitando o acúmulo e o uso desnecessário para outras funções, ou seja, a taxa de crescimento é diminuída.

As afirmações supracitadas são suportadas pelos dados apresentados na Tabela 13 e na Figura 36, em que é possível observar diminuição da concentração de sacarose (145) e de seus produtos hidrolíticos, glicose (144) e frutose (126), no verão e inverno para ambos os clones.

FIGURA 36: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: SACAROSE; FRUTOSE; GLICOSE E GALACTOSE NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE



NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 observadas $p < 0,05$.

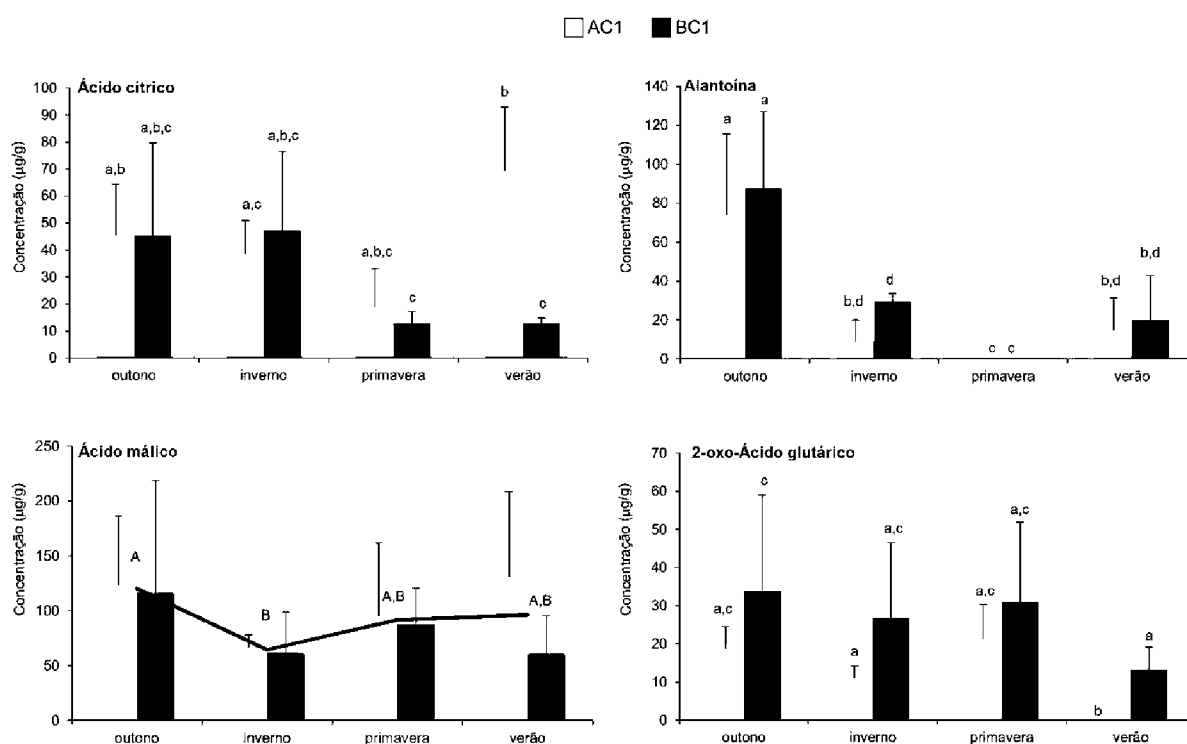
FONTE: O autor (2018)

A galactose (128) é usada na via metabólica da produção de hidratos de açúcares tais como manitol e sorbitol e na via glicolítica para produção de amino açúcares (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os hidratos de açúcares são relacionados com a proteção térmica dos tecidos, tanto decorrente de excesso de calor com perda de água, como pelo frio, que pode inibir as atividades enzimáticas. Assim é natural esperar que a galactose tenha seu perfil bioquímico alterado em decorrência da sazonalidade, com seu acúmulo em dias frios (Figura 36). Em dias quentes, embora a galactose seja usada para produção de metabólitos relacionados com a proteção térmica, a alta radiação solar, maior fotossíntese, evita que seja necessário o acúmulo deste metabólito, já que não há necessidade de proteção térmica causada por frio.

Já o ácido cítrico (139) apresenta desequilíbrio em sua concentração em períodos mais quentes do ano com aumento para o clone AC1 e diminuição para BC1, o mesmo padrão de distribuição é visto para o ácido málico (140), (Tabela 13, Figura 37). O ácido cítrico pode ser alterado devido ao estresse salino (PARIDA;

PANDA; RANGANI, 2018), comum em períodos quentes do ano, já que as temperaturas elevadas ($> 25^{\circ}\text{C}$) diminuem a umidade natural da planta. Como ácido málico é produzido na mesma rota (ciclo do ácido cítrico) é natural que suas concentrações sejam relacionadas. O malato atua para equilibrar a carga e a pressão osmótica, o acúmulo de malato pode ser considerado uma resposta adaptativa à salinidade (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Da mesma forma, além dos osmólitos convencionais como sacarose, ácidos orgânicos como o ácido 2-oxoglutárico (8) e alantoína (86) também podem atuar como osmoprotetores (SILVENTE *et al.*, 2012) (Tabela 13 e Figura 37).

FIGURA 37: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO CÍTRICO; ALANTOÍNA; ÁCIDO MÁLICO E 2-OXO-ÁCIDO GLUTÁRICO NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE



NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$. Caracteres minúsculos destacam as diferenças entre os clones AC1 e BC1, e maiúsculos a diferença entre as estações.

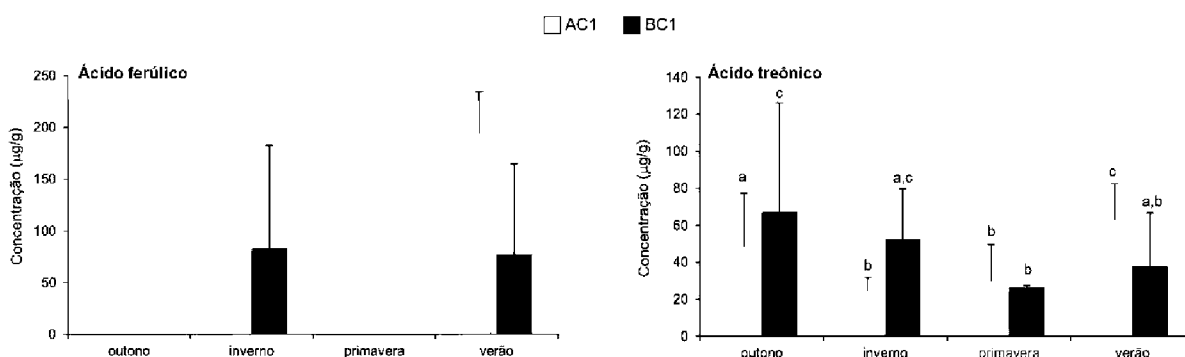
FONTE: O autor (2018)

Plantas em zonas temperadas, como a erva-mate, frequentemente experimentam uma baixa temperatura que tem um impacto adverso no crescimento e desenvolvimento (MEGHA; BASU; KAV, 2017). O estresse de baixa temperatura inclui o processo de refrigeração (abaixo de 15°C , em período de inverno). Esse

estresse, devido ao abaixamento da temperatura, causa distúrbios na homeostase celular, danos na membrana, inibição do transporte do floema, respiração e síntese de plastídios (SHI *et al.*, 2012). Assim as plantas desenvolveram numerosos mecanismos bioquímicos e fisiológicos para sobreviverem nessa condição. Durante as estações frias, as plantas sintetizam muitos metabólitos crioprotetores, como, açúcares solúveis (e.g. manitol, galactose), vários aminoácidos e poliaminas e para aumentar sua tolerância ao estresse de baixa temperatura. Muito desses metabólitos crioprotetores estão envolvidos no ciclo do ácido cítrico (malato, fumarato (7) e citrato), que sugerem que a regulação do ciclo do ácido cítrico ocorre em plantas como resposta ao frio (Figura 37A) (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

As respostas diferentes destes metabólitos, para os distintos clones (AC1 e BC1), podem estar relacionadas com a plasticidade fenotípica, neste caso, estar fortemente associada ao genótipo, e esse efeito térmico protetor ser regulado por genes específicos. Analogamente, temperaturas e intensidade luminosa elevadas podem levar ao consumo e ou à geração de antioxidantes como ácido ascórbico (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018) e ferúlico (94) (Tabela 13, Figura 38). O ácido treônico (112) está relacionado à biossíntese do ácido ascórbico, e à alteração desse metabólito sob estresse térmico (Figura 28), pode ser considerado como uma estratégia de defesa adaptada pelas plantas para combater o estresse oxidativo no frio (DU *et al.*, 2011).

FIGURA 38: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO FERÚLICO E ÁCIDO TREÔNICO NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE

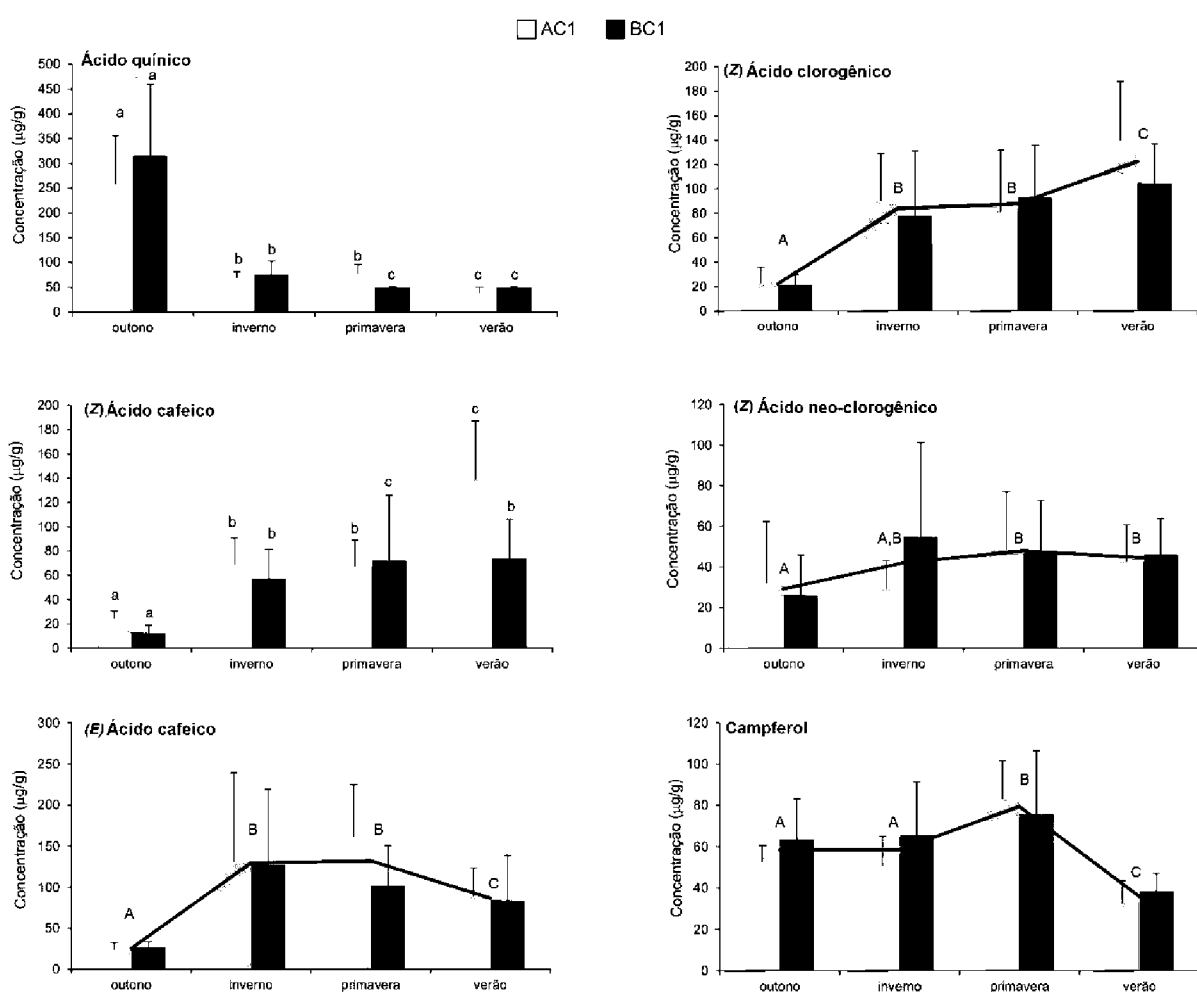


NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 observadas $p < 0,05$.

FONTE: O autor (2018)

Neste mesmo sentido, os compostos antioxidantes da erva mate ácido cafeico (92, 93) e os ácidos clorogênicos (94-99), bem como seu precursor ácido quínico (141), também são modificados em resposta à sazonalidade (Tabela 13), principalmente os estereoisômeros *Z*, devido à foto-isomerização evitando a oxidação dos tecidos (Figura 39).

FIGURA 39: HISTOGRAMAS COMPARATIVOS DOS METABÓLITOS: ÁCIDO QUÍNICO ; *Z*-ÁCIDO CAFEICO; *E*-ÁCIDO CAFEICO; *Z*-ÁCIDO CLOROGÊNICO; *Z*-ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO E CAMPFEROL NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE



NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$. Caracteres minúsculos destacam as diferenças entre os clones AC1 e BC1, e maiúsculos a diferença entre as estações.

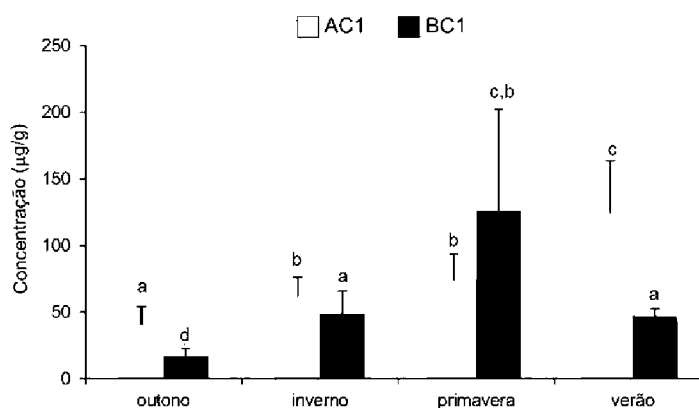
FONTE: O autor (2018)

O flavonoide campferol (17) também apresentou mudanças decorrentes da sazonalidade principalmente nos períodos mais quentes do ano (Figura 39). Embora estas mudanças tenham sido diferentes para cada clone, os motivos do seu

consumo e produção devem também estar relacionados com as atividades antioxidantes relacionadas à temperatura e intensidade luminosa, atividades menos importantes em épocas mais frias do ano.

A cafeína, composto bioativo importante para indústria de bebidas e farmacêutica (HICK, MEIJA, 2007), apresentou menor concentração para as estações mais frias do ano, e aumento de produção na primavera para o clone BC1 e em verão para AC1 (Tabela 13, Figura 40). Esse fato pode estar associado com a época de floração, reprodução (frutificação) e crescimento de erva-mate (SOUSA; DAROS; STURION, 2003). A cafeína é um metabólito secundário biossintetizado como resposta evolutiva para atrair polinizadores e afastar predadores (OESTREICH-JANZEN, 2016). Assim a planta, provavelmente, induz a maior produção de cafeína em épocas mais quentes para propiciar a polinização e impedir que herbívoros consumam suas folhas e prejudiquem o seu crescimento.

FIGURA 40: HISTOGRAMA COMPARATIVO DA CAFEÍNA NOS DIFERENTES CLONES TESTADOS FRENTE A SAZONALIDADE



NOTA: As letras referem-se as diferenças estatísticas entre os clones AC1 e BC1 observadas $p < 0,05$.

FONTE: O autor (2018)

CONCLUSÃO

A erva-mate apresenta mudanças na regulação cíclica diária, como resposta à mudança de luminosidade, sendo que dentre os compostos afetados os relacionados com o ciclo do carbono ganham destaque. Como, o indício do acúmulo de sacarose como amido, para decomposição desta em açúcares redutores e manutenção de processos metabólicos basais na ausência de fotossíntese.

A sazonalidade foi mais relevante na distribuição dos metabólitos que as controladas pelos ritmos circadianos, o que pode estar relacionado à variação luminosa (*i.e.* dias mais longos em verão), além da grande contribuição da temperatura, a qual é acumulativa e, diferente, em cada época do ano.

Os carboidratos apresentam menor concentração no verão já que nesse período são consumidos rapidamente nos processos de crescimento da planta.

Entre os compostos antioxidantes da erva-mate os ácidos clorogênicos são regulados pelos ritmos circadianos, e consumidos em alta luminosidade evitando a foto-oxidação dos tecidos sendo que os isômeros Z destes compostos são os mais fortemente afetados. Os períodos mais quentes do ano estimulam o consumo destes antioxidantes, assim como do campferol.

Os metabólitos ácido málico, ácido cítrico e alantoína têm suas produções alteradas nas estações mais quentes, sendo que esses compostos podem ser usados como indicativos de estresse salino, pois atuam como osmoprotetores.

No inverno ocorre a produção de metabólitos crioprotetores, como os açúcares solúveis e outros compostos regulados pelo ciclo do ácido cítrico.

A cafeína, em erva-mate, foi altamente influenciada pela plasticidade fenotípica, sendo que sua máxima produção varia de clone para clone durante o ciclo circadiano. Para o clone AC1 o acúmulo ocorre em período fotossintético ativo e para BC1 em escuro. A cafeína é catabolizada nos primeiros estímulos luminosos. Com relação à sazonalidade a cafeína tem sua produção maximizada nas estações mais quentes do ano. A classificação em teores de alta e baixa cafeína depende do horário e período do ano, no qual o tecido foliar de erva-mate foi coletado, sendo que os períodos com maior concentração estão associados às estações quentes, e com relação ao horário é necessário verificar a sua distribuição nos períodos claro e escuro.

REFERÊNCIAS

- AITCHISON, J. **The statistical analysis of compositional data**. The Blackburn Press. Caldwell. New Jersey. 1986
- ALVES, C.; BARROS, M. T.; MAYCOCK, C. D.; & VENTURA, M. R. An efficient transformation of quinic acid to shikimic acid derivatives. **Tetrahedron**, v. 28, n. 55, p. 8443-8456, 1999.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008.
- BASTOS, D. H.M; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.
- BERG, V. R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; & VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, 142 p., 2006.
- BRO, R.; SMILDE, A. K. Centering and scaling in component analysis. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 1, p. 16-33, 2003.
- CARDOZO JR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, **Coleção espécies arbóreas brasileiras**, v. 1. 765 p. 2003.
- CROGHAN, C.; EGEGHY, P. P. **Methods of dealing with values below the limit of detection using SAS**. Southern SAS User Group, US-EPA, p. 22-24, 2003.
- DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; DA SILVA FILHO, H. H.; VALCANAIA, M. M.; DE JESUS, P. C.; & ZENI, A. L. B. Seasonal variation in the antioxidant phytocompounds production from the *Morus nigra* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 323-330, 2018.
- DETHLOFF, F. ERBAN, A., ORF, I., ALPERS, J., FEHRLE, I., BEINE-GOLOVCHUK, O., ... & KOPKA, J. Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry. In: **Plant Cold Acclimation**. Humana Press, New York, NY, p.171-197, 2014.
- DESBROSSES, G. G.; KOPKA, J.; UDVARDI, M. K. Lotus japonicus Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for

the Study of Plant-Microbe Interactions . **Plant Physiology**, v. 137, p.1302–1318. 2005.

DUNLAP, C.; LOROS, J.; DECOURSEY, J. **Chronobiology: biological timekeeping**. Sinauer Associates, 2004.

DU, H.; WANG, Z.; YU, W.; LIU, Y.; HUANG, B. Differential metabolic responses of perennial grass *Cynodon transvaalensis* × *Cynodon dactylon* (C4) and *Poa pratensis* (C3) to heat stress. **Physiologia plantarum**, v. 141, n. 3, p. 251-264, 2011.

ESPINOZA, C.; DEGENKOLBE, T., CALDANA, C., ZUTHER, E., LEISSE, A., WILLMITZER, L., ... & HANNAH, M. A. Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in *Arabidopsis*. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14101, 2010.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; NAKAMICHI, N.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, N.; SAKAKIBARA, H.; ... & SAITO, K. Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 17, v. 106, p. 7251–7256, 2009.

FUTUYMA, D. J. *Biologia Evolutiva*. FUNPEC Editora. 1998.

GRAF, A.; SCHLERETH, A.; STITT, M.; SMITH, A. M. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9458-9463, 2010.

GIBON, Y.; USADEL, B.; BLAESING, O. E.; KAMLAGE, B.; HOEHNE, M.; TRETHEWEY, R., & STITT, M. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. **Genome biology**, v. 7, n. 8, p. R76, 2006.

GOODSPEED, D.; CHEHAB, E. W.; MIN-VENDITTI, A.; BRAAM, J.; COVINGTON, M. F. *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 12, p. 4674-4677, 2012.

GUTIÉRREZ, R. A.; STOKES, T. L.; THUM, K.; XU, X.; OBERTELLO, M.; KATARI, M. S.; ... & CORUZZI, G. M. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 12, p. 4939-4944, 2008.

HARMER, S. L.; HOGENESCH, J. B.; STRAUME, M.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU, T.; ... & KAY, S. A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2110-2113, 2000.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138 – 151, 2007.

HOFFMAN, D. E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment** . v. 33, p. 1298–1313, 2010.

HOTTA, C. T.; GARDNER, M. J.; HUBBARD, K. E.; BAEK, S. J.; DALCHAU, N.; SUHITA, D.; ... & WEBB, A. A. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 3, p. 333-349, 2007.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R.; Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

IRANI, S.; TODD, C. D. Exogenous allantoin increases Arabidopsis seedlings tolerance to NaCl stress and regulates expression of oxidative stress response genes. **Journal of plant physiology**, v. 221, p. 43-50, 2018.

IVANISEVIC, J.; BENTON, H. P.; RINEHART, D.; EPSTEIN, A.; KURCZY, M. E.; BOSKA, M. D.; ... & SIUZDAK, G. An interactive cluster heat map to visualize and explore multidimensional metabolomic data. **Metabolomics**, v. 11, n. 4, p. 1029-1034, 2015.

JOHNSON, C. H. Testing the adaptive value of circadian systems. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, v 393, p. 818-837, 2005.

KARAPETYAN, S.; DONG, X. Redox and the circadian clock in plant immunity: A balancing act. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 119, p. 56-61, 2017.

KIEŁBOWICZ-MATUK, A.; CZARNECKA, J. Interplays of Plant Circadian Clock and Abiotic Stress Response Networks. In: **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**, v.1, p. 487-506, 2014.

KUHLMAN, S. J.; MACKEY, S. R.; DUFFY, J. F. Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1-6, 2007.

KVALHEIM, O. M.; BRAKSTAD, F.; LIANG, Y. Preprocessing of analytical profiles in the presence of homoscedastic or heteroscedastic noise. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 43-51, 1994.

LIMA, N. R. W. L.; SODRÉ, G. A.; RODRIGUES, H. R.; LIMA, S. R. D. P.; LOBÃO, A. Q.; JOFFILY, A. Plasticidade fenotípica. **Revista de Ciência Elementar**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 2017.

LOCKE, J. C.; KOZMA-BOGNÁR, L.; GOULD, P. D.; FEHÉR, B.; KEVEI, E.; NAGY, F.; ... & MILLAR, A. J. Experimental validation of a predicted feedback loop in the

multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular systems biology**, v. 2, n. 1, p. 59, 2006.

LÓPEZ-ORENES, A.; BUESO, M. C.; PÁRRAGA-AGUADO, I. M.; CALDERÓN, A. A.; FERRER, M. A. Coordinated role of soluble and cell wall bound phenols is a key feature of the metabolic adjustment in a mining woody fleabane (*Dittrichia viscosa* L.) population under semi-arid conditions. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 1139-1151, 2018.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

MAIBAM, P.; NAWKAR, G. M.; PARK, J. H.; SAHI, V. P.; LEE, S. Y.; & KANG, C. H. (The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 11527-11543, 2013.

MAGEL, E.; EINIG, W.; HAMPP, R. Carbohydrates in trees. In: **Developments in crop science**. v. 26, p. 317-336, 2000.

MARASCHIN, M.; ZEGGIO, A. R. S.; TOMAZZOLI, M. M.; OLIVEIRA, S. K.; RAMLOV, F.; VELEIRINHO, M. B.; ROCHA, M. Metabolômica e quimiometria como ferramentas para análises químico (bio) diversas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 17-49, 2017.

MARTINS, S. C; ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; DAMATTA, F. M. In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLoS One**, v. 9, n. 4, 94862 p., 2014.

MCCLUNG, C. R. Plant circadian rhythms. **The Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 792-803, 2006.

MEGHA; BASU, U.; KAV, N. N.V. Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. **Plant, cell & environment**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2018.

MOING, A. Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. In **Developments in Crop Science**. v. 26, p. 337-358, 2000.

NOZUE, K.; COVINGTON, M. F.; DUEK, P. D.; LORRAIN, S.; FANKHAUSER, C.; HARMER, S. L.; MALOOF, J. N. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. **Nature**, v. 448, n. 7151, 358 p., 2007.

OESTREICH-JANZEN, S. Caffeine: characterization and properties. **Encyclopedia of Food and Health**. p.556- 572, 2016.

PARIDA, A. K.; PANDA, A.; RANGANI, J. Metabolomics-Guided Elucidation of Abiotic Stress Tolerance Mechanisms in Plants. In: **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. Chapter 5, p. 89-131, 2018.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: julho de 2018.

SALUM, M. L.; MAÑEZ, P. A.; LUQUE, F. J.; ERRA-BALSELLS, R. Combined experimental and computational investigation of the absorption spectra of E-and Z-cinnamic acids in solution: The peculiarity of Z-cinnamics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 128-135, 2015.

SHI, Y.; S., HOU, L.; HUANG, X.; ZHANG, X.; GUO, H.; YANG, S. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 24, p. 2578–2595, 2012.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One**, v. 7, n. 6, e38554 p., 2012.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 9, p. 1126-1149, 2007.

SOMMAVILLA, V.; HAIDACHER-GASSER, D.; SGARBOSSA, M.; & ZIDORN, C. Seasonal variation in phenolics in leaves of *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 110-114, 2012.

SOUSA, V. A.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9., 2003, Nova Prata, RS. Floresta: função social: anais. Nova Prata: Prefeitura Municipal. 2003.

STRAYER, C.; OYAMA, T.; SCHULTZ, T. F.; RAMAN, R.; SOMERS, D. E.; MÁS, P.; ... & KAY, S. A. Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. **Science**, v. 289, n. 5480, p. 768-771, 2000.

STURION, J. A.; RESENDE, M.D.V. de Seleção de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para produtividade, estabilidade e adaptabilidade temporal de massa foliar. *Boletim de Pesquisa Florestal*, n.50, p.37-51, 2005.

TÁLOS-NEBEHAJ, E.; HOFMANN, T.; ALBERT, L.. Seasonal changes of natural antioxidant content in the leaves of Hungarian forest trees. **Industrial crops and products**, v. 98, p. 53-59, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TECHIO, V. Y.; CAGLIARI, A. Y.; FLOSS, P. Y.; CROCE, D. Morfometria e nervação foliar em procedências de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) (Aquifoliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p.433-437, 2009.

TUTTY, J. R.; HICKLENTON, P. R.; KRISTIE, D. N.; MCRAE, K. B. The influence of photoperiod and temperature on the kinetics of stem elongation in *Dendranthema grandiflorum*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119, n. 2, p. 138-143, 1994.

VASSALLO, A.; CORREA, P.; DE STÉFANI, E.; CENDÁN, M.; ZAVALA, D.; CHEN, V.; DENEIO-PELLEGRINI, H. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 75, n. 6, p. 1005-1009, 1985.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306, 2012.

WEISE, S.E.; WEBER, A.P.M; SHARKEY, T. D. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. **Planta**, v. 218, n. 3, p. 474-482, 2004.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico. **Embrapa Florestas. Circular técnica**, v.157, p.1-4, 2008.

WIJNEN, H.; YOUNG, M.W. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. **Annu. Rev. Genet.**, v. 40, p. 409-448, 2006.

WU, W.; NOBLE, W. S. Genomic data visualization on the Web. **Bioinformatics**, v. 20, n. 11, p. 1804-1805, 2004.

WU, S.; LI, J., WANG, Q.; CAO, H.; CAO, J.; XIAO, J. Seasonal dynamics of the phytochemical constituents and bioactivities of extracts from *Stenoloma chusanum* (L.) Ching. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 458-466, 2017.

CAPÍTULO 3
PERFIL METABÓLICO DE ERVA-MATE EM FUNÇÃO DE MUDANÇAS DA
FERTIRRIGAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

1 INTRODUÇÃO

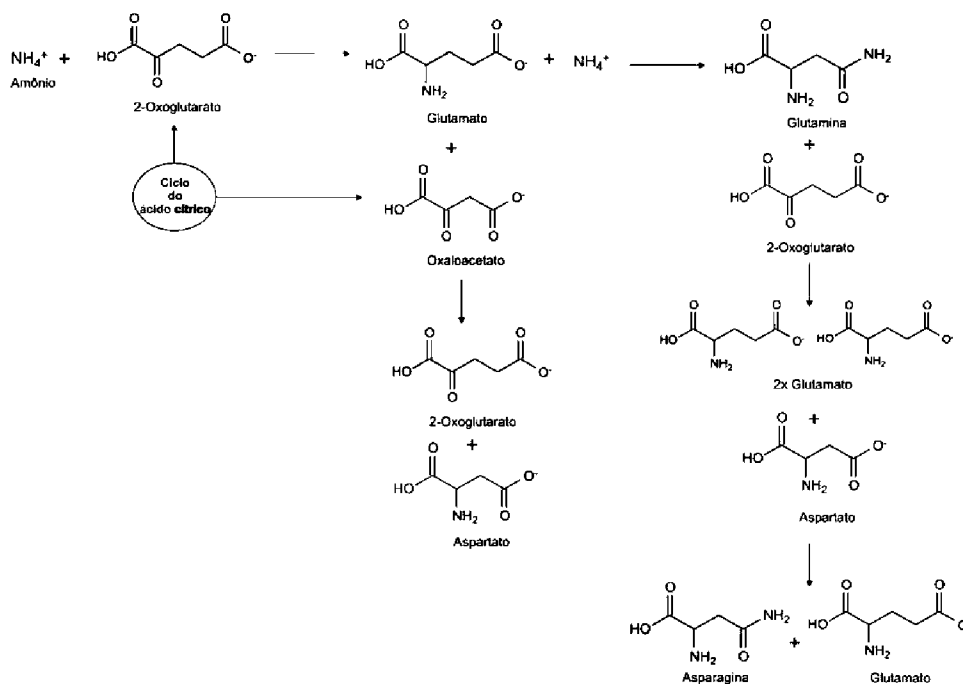
A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.), planta nativa da floresta atlântica brasileira, é rica em compostos fenólicos (e.g. ácidos clorogênicos) e nitrogenados (e.g. cafeína), que possuem diversos efeitos benéficos à saúde humana (e.g. vasodilatador, antioxidante) além de estarem relacionados com o aroma e sabor de chás e outras bebidas produzidas a partir das folhas da erva (HECK; MEJIA, 2007). Esses compostos representam uma característica fenotípica importante para expansão comercial de erva-mate para outros setores industriais, além do alimentício. Sendo que a produção dos compostos bioativos da erva-mate, como a metilxantinas e compostos fenólicos podem ser dependentes da assimilação e fixação de nitrogênio (N) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O N é um nutriente essencial e um sinal metabólico detectado e traduzido, resultando no controle da expressão gênica em plantas, que podem fixar fontes inorgânicas de N (i.e. NH_4^+ , NO_3^-) para fontes orgânicas (i.e. aminoácidos) (KUSANO *et al.*, 2011). Sendo que essa incorporação de nutrientes minerais em substâncias orgânicas, como pigmentos, cofatores de enzimas, lipídios, ácidos nucleicos e aminoácidos requer uma série complexa de reações bioquímicas que estão entre as reações que exigem maior energia nos organismos vivos (BLOOM; SUKRAPANNA; WARNER, 1992; TAIZ; ZEIGER, 2013). O nitrogênio é o nutriente requerido, pelos vegetais, sendo que após sua assimilação, seu metabolismo é estreitamente coordenado com o metabolismo do carbono (C) (e.g. ciclo do ácido cítrico) nos processos fundamentais que permitem o crescimento das plantas (GUTIERREZ *et al.*, 2007; STITT; LUNN; USADEL, 2010). A assimilação do N, nas plantas, pode ocorrer de duas formas: i) fixação da forma gasosa N_2 , que acontece apenas em associação simbiótica com outros micro-organismos, já que a quebra da ligação tripla entre as unidades moleculares de N envolve grandes gastos energéticos (VANDE BROEK; VANDERLEYDEN, 1995); ii) assimilação do N como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) pelas raízes preferencialmente, já que as partes verdes das plantas, não possuem enzimas necessárias para fixação de N, uma vez que essas enzimas podem ser facilmente inativadas pelo calor e ação da luz (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A maioria das plantas, tanto cultivadas como nativas, absorvem maior quantidade de N na forma de NO_3^- , pois o NH_4^+ é oxidado facilmente por bactérias

nitrificantes no solo (HELDT; PIECHULLA, 2005), entretanto somente a forma amoniacal é usada para produção de aminoácidos e seus subprodutos (Figura 41). Logo, todo nitrogênio assimilado como nitrato, em células mesofílicas no cloroplasto, é convertido em NH_4^+ , no citoplasma, que depois é transformado, usando compostos da via de assimilação do carbono, em glutamina e glutamato, para, então, ser utilizado na formação de outros aminoácidos e compostos que são transportados, via xilema (WARNER; KLEINHOF, 1992; PALLARDY, 2008). Os aminoácidos, cerca de vinte, são usados na formação de proteínas que participam como enzimas nos processos metabólicos das plantas, tendo assim um papel funcional e estrutural (HELDT; PIECHULLA, 2005). Percebe-se então que a deficiência de N é um fator limitante para o crescimento vegetal (SCHACHTMAN; SHIN, 2007; KROUK *et al.*, 2010).

FIGURA 41: ASSIMILAÇÃO SIMPLICADA DE NITROGÊNIO AMONIAICAL EM AMINOÁCIDOS GLUTAMINA E ASPARAGINA



FONTE: O autor (2018).

Na Figura 42 são mostradas as interações complexas das redes bioquímicas das vias de assimilação do N e do C, desde a produção e consumo de metabólitos, que são influenciadas pelo metabolismo do N, como as várias etapas de redução, sinalização e transporte do N já fixado (MILLER *et al.*, 2008; VIDAL; GUTIERREZ, 2008). A assimilação de N tem como ponto chave o ciclo do ácido cítrico (Figura 42,

que para além da produção em massa a qualidade das folhas (concentração de compostos bioativos) é uma característica importante durante a seleção clonal para fins industriais específicos. Por conseguinte, estudos que viabilizem o entendimento das respostas fisiológicas, através da compreensão das vias metabólicas e seus produtos (representantes finais de fenótipos expressos), frente a alterações relacionadas a absorção de N para a erva-mate, podem fornecer um instantâneo global dos mecanismos bioquímicos que operam na formação destes metabólitos, amparando os programas de melhoramento genético da espécie. A metabolômica pode ser usada como técnica não direcionada na obtenção de informações sobre as respostas fenotípicas as mudanças fisiológicas desencadeadas pela alteração da nutrição de N (SCHEIBLE *et al.*, 1997; TSCHOEP *et al.*, 2009). Uma vez que os metabólitos não são apenas produtos catalíticos de reações enzimáticas, mas também, reguladores ativos e representantes finais dos fenótipos expressos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar mudanças no perfil metabólico de folhas e raízes de erva-mate decorrentes de variações na composição nutricional de nitrogênio total em sistema de fertirrigação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, em clones com concentrações contrastantes de cafeína, se mudanças na composição nutricional de nitrogênio alteram o seu metabolismo;
- Correlacionar as informações obtidas com as vias metabólicas envolvidas na formação de compostos de interesse comercial (*i.e.* cafeína, ácidos clorogênicos) usando estatística e técnicas quimiométricas multivariadas nos dados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes e padrões utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha), com grau de pureza de 97-99 % e grau CLAE para os solventes Metanol e Clorofórmio (Merck, BR). Todos os compostos utilizados são listados na Tabela 14.

TABELA 14: PADRÕES E REAGENTES UTILIZADOS DURANTE AS ANÁLISES.

COMPOSTO	CAS	FUNÇÃO
Metanol		Solvente (agente extrator)
Clorofórmio		Solvente (agente extrator)
Piridina	CAS 110-86-1	Solvente
4-Dimetilamino-piridina	CAS 110-86-1	Catalisador
¹³ C ₆ -Sorbitol	CAS 121067-66-1	Padrão interno (fase polar)
Ácido nonadecanóico	CAS 1731-94-8	Padrão interno (fase apolar)
Cloridrato de Metoxiamina	CAS 593-56-6	Derivatizante
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA)	CAS 25561-30-2	Derivatizante
<i>n</i> -decano	CAS 124-18-5	Padrões de alcanos para cálculo de índice de retenção
<i>n</i> -dodecano	CAS 11240-3	
<i>n</i> -pentadecano	CAS 629-62-9	
<i>n</i> -octadecano	CAS 593-45-3	
<i>n</i> -nonadecano	CAS 629-92-5	
<i>n</i> -docosano	CAS 629-97-0	
<i>n</i> -octacosano	CAS 630-02-4	
<i>n</i> -dotriacontano	CAS 544-85-4	
<i>n</i> -hexatriacontano.	CAS 630-06-8	

3.2 ESTABELECIMENTO E SELEÇÃO DAS MUDAS

Os experimentos foram realizados na EMBRAPA Florestas localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil, utilizando dois clones comerciais IVA 34 e IVA 10, fêmeas, provenientes de um programa de melhoramento genético desenvolvido pela EMBRAPA Florestas; na região de Ivaí-PR.

TABELA 15: CLONES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.

Clone	Gênero	Cafeína (%)	Classificação*
IVA34	Fêmea	2,28 ± 0,07	Alta
IVA10	Fêmea	0,78 ± 0,03	Baixa

Nota: *Classificação segundo dados fornecidos pela Embrapa Florestas.

As plantas utilizadas foram clonadas por método de estaquia e após 2 meses, foram transplantadas e mantidas em um minijardim clonal em casa de vegetação, dispostos em sistema semi-hidropônico de fertirrigação com pH 5, em canaletão com areia, em cinco diferentes concentrações de nitrogênio (Tabela 16).

Para o experimento foi adotado como base a fertirrigação padrão já usado pela Embrapa Florestas (C2, Tabela 16). Os diferentes tratamentos nutricionais foram alterados somente em relação às doses de nitrogênio, e a proporção $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi mantida em até 3,12 mg L⁻¹ de acordo com Wendling e Dutra (2008).

TABELA 16: SOLUÇÕES DE NUTRIENTES USADA

Nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)				
	C1	C2*	C3	C4	C5
NO_3^-	64,00	156,00	243,00	433,00	624,00
NH_4^+	50,00	50,00	137,00	327,00	518,00
PO_4^{2-}	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
K^+	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Ca^{+2}	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Mg^{+2}	22,50	22,50	22,50	22,50	22,50
SO_4^{2-}	38,45	38,45	38,45	38,45	38,45
B^{+3}	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Cu^{+2}	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Fe^{+3}	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Mn^{+2}	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Zn^{+2}	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Mo^{+2}	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
N total	114	206	380	760	1142
$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	1,28	3,12	1,77	1,32	1,20

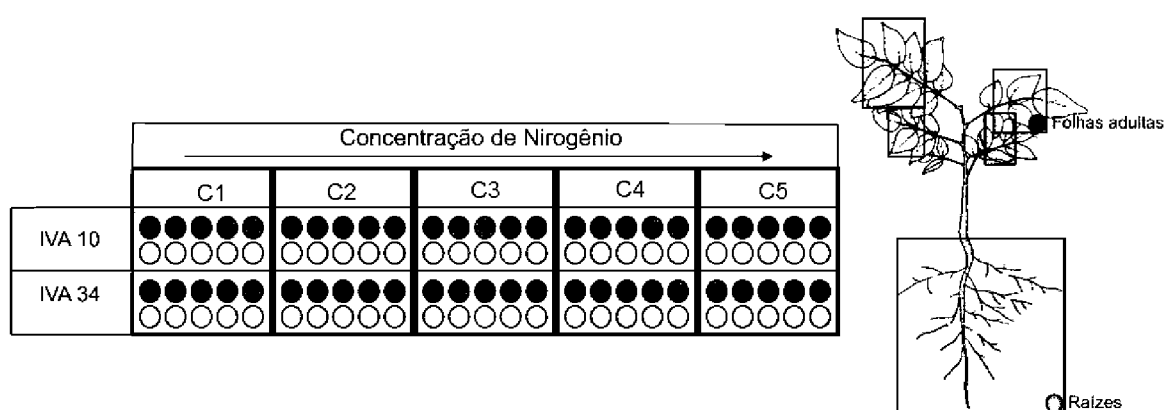
NOTA: * Solução padrão usada em sistema hidropônico com fertirrigação pela Embrapa florestas.

As mudas foram mantidas sob irrigação por gotejamento, feita com as diferentes soluções nutritivas (Tabela 16), duas vezes por dia na estação de inverno (2,5 L m⁻²/aplicação) por um período de 4 min e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão (1,7 L m⁻²/aplicação) por um período de 3 min e 6 segundos, com podas de manutenção das mudas a cada 2 meses. A coleta do material vegetal

(folhas adultas e raízes) para a análise dos metabólitos foi realizada após 8 meses de permanência das mudas no sistema semi-hidropônico.

O tecido vegetal foliar adulto foi coletado às 11 h da manhã, no mês de novembro em cinco repetições biológicas de cada clone, em região mediana da muda e posição intermediária no galho (Figura 43). Em seguida o material foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido (dentro de até 10 s após o corte). Do mesmo modo, após 15 dias das coletas das folhas, as raízes, dos mesmos clones, foram coletadas após lavagem com água (para retirar excesso de areia e substrato), e após o corte, o material foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido. Todos os materiais foram macerados em cadinho contendo $N_{2(l)}$ e armazenados a $-80^{\circ}C$.

FIGURA 43: REPRESENTAÇÃO DA COLETA DE FOLHAS E RAÍZES DE CINCO REPETIÇÕES BIOLÓGICAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO COM CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE NITROGÊNIO, DE ACORDO COM A TABELA 16.



FONTE: O autor (2018).

3.3 EXTRAÇÃO

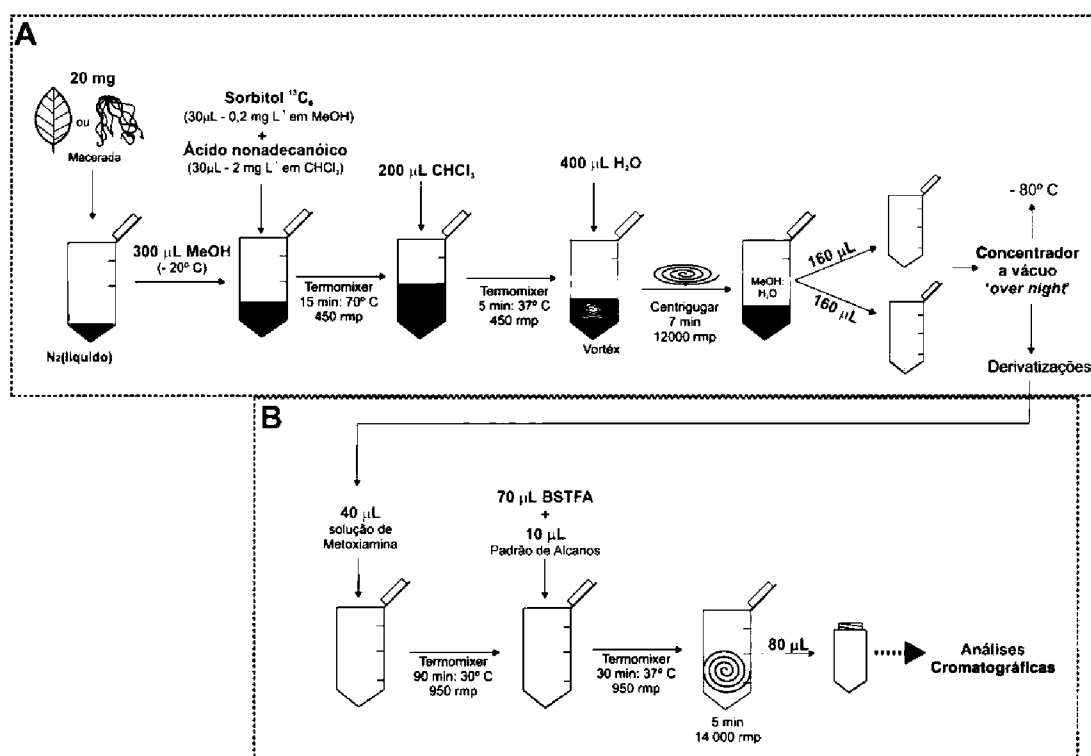
O método de extração foi realizado em fluxo contínuo seguindo o descrito por Dethloff e colaboradores (2014). Brevemente: foram transferidos 20 mg (± 5 mg) do material vegetal anteriormente congelado e triturado, para um tubo Eppendorf de 2 mL. As amostras foram mantidas congeladas em $N_{2(l)}$ durante a pesagem, para evitar processos de oxidação. Após, foram adicionados com auxílio de micropipeta (Eppendorf) 300 μL de metanol pré-arrefecido a $-20^{\circ}C$. O material vegetal e o solvente, então, foram misturados em vórtex. A este material foi adicionado 30 μL de $^{13}C_6$ -Sorbitol (padrão interno, 0,2 mg mL^{-1} em metanol) e 30 μL padrão de ácido nonadecanóico (controle da extração, 2 mg mL^{-1} em clorofórmio). Posteriormente, a

extração ocorreu em equipamento Thermomixer (Eppendorf), sob agitação constante de 450 rpm por 15 min a 70 °C (após o primeiro minuto de agitação os eppendorfs era abertos, afim de retirar o excesso de pressão). Após a incubação as amostras eram resfriadas a temperatura ambiente, e a elas adicionado 200 µL de clorofórmio utilizando-se de seringa de vidro graduada. O conteúdo era misturado em vórtex e em seguida aquecido novamente no Thermomixer a 450 rpm durante 5 min a 37° C. Então, foram adicionados 400 µL de água ultrapura, o conteúdo foi misturado em vórtex por cerca de 20 segundos e centrifugado (Eppendorf *centrifuge* 5417R) durante 7 min a 12000 rpm. Duas alíquotas de 160 µL da fase polar (superior) foram transferidas para dois tubos de eppendorff cônico de 1,5 mL (i.e. uma alíquota para cada tubo), e o extrato era concentrado e seco sob vácuo no 'Speed Vac' (Concentrador plus - Eppendorf, modo V-AQ sem aquecimento) durante a noite, com posterior armazenagem a -80° C até a derivação. O processo de extração utilizado está apresentado na Figura 44A.

3.4 DERIVATIZAÇÕES

A metoximação foi realizada adicionando ao extrato seco 40 µL de uma solução contendo 5 mg de 4-(dimetilamina)-piridina e 40 mg de cloridrato de metoxiamina em 1 mL de piridina. A solução foi então misturada em vórtex e a reação aconteceu em Thermomixer a 950 rpm durante 90 min a 30° C. Após o tempo de incubação, foram adicionados 70 µL do agente de silição BSTFA, e 10 µL de mistura de alcanos, preparada em piridina na concentração de 0,20 mg mL⁻¹, exceto n-decano e *n*-hexatriacontano que foram preparados na concentração a 0,40 mg mL⁻¹. Essa solução foi misturada em vórtex, e incubados a 37° C em Thermomixer a 950 rpm durante 30 min. Logo após os tubos eppendorfs foram centrifugados a 14000 rpm por 5 min e uma alíquota de 80 µL transferida para vial com fundo cônico (Thermo, 0,5 mL), e levados para análises cromatográficas (Figura 44B).

FIGURA 44: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO (A) E DERIVATIZAÇÃO (B) DOS TECIDOS VEGETAIS



FONTE: O Autor (2018).

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O perfil cromatográfico das amostras foi adquirido através de análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa de tempo de voo por ionização por impacto de elétrons (CG-TOF/IE-EM) como especificado por Dethloff e colaboradores (2014) no Instituto Max Planck (Potsdam-Golm, Alemanha). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando injeção automática (Agilent, Böblingen, Alemanha) em um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890N) com injetor split e splitless com controle de pressão eletrônico de até 150 psi, acoplado a um espectrômetro de massas de tempo de voo Pegasus III (LECO Instrumento GmbH, Mönchengladbach, Alemanha). As amostras foram injetadas no modo splitless (1 µL) e no modo split com divisão de fluxo 1:30 (1 µL), dependendo da concentração dos analitos nas amostras. Os analitos foram separados através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm, Agilent), com a temperatura do injetor à 230 °C e linha de transferência a 250 °C, o gás de arraste usado foi o hélio a fluxo constante de 0,6 mL min $^{-1}$. A programação de temperatura do forno foi: 70 °C, isoterma de 1 min, aquecimento até 350 °C na taxa de 9 °C min $^{-1}$, com isoterma final

de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons à 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 200° C, com resolução de massa nominal com taxa de varredura ajustada para 20 s⁻¹, com intervalo de massas definido para m/z = 70–600.

3.6 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES

Os cromatogramas gerados pelo software ChromaTOF (Versão 4.22; LECO, St. Joseph, EUA) eram exportados em formato de arquivo NetCDF para posterior deconvolução e identificação dos compostos, através da comparação dos espectros de massas e índice de tempo de retenção dos compostos com aqueles presentes no banco de dados metabolômicos (*GDM database*, KOPKA *et al.*, 2005, HUMMEL *et al.*, 2007; Alemanha) usando o software TagFinder (LUEDEMANN *et al.* 2008). As diretrizes para identificação de metabólitos supervisionados manualmente foram (i) a presença de pelo menos três fragmentos de massa específicos por composto e (ii) um desvio do índice de retenção inferior a 1,5% (STREHMEL *et al.*, 2008). As intensidades dos metabólitos foram normalizadas pelo peso das amostras e padrão interno (¹³C₆-Sorbitol).

As variáveis foram analisadas utilizando o software R com os pacotes: *multcomp*, *stats*, *lattice*, *agricolae*, *ExpDes.pt*, *effects* e *gplots* (R CORE TEAM; 2018). Primeiramente as variáveis individualizadas foram testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk). As variáveis com distribuição de probabilidade normal foram analisadas através da ANOVA com teste F ($p > 0,05$). As variáveis com outras distribuições de probabilidade foram analisadas utilizando o GLM (do inglês 'General Linear Models' - Modelos Lineares Generalizados) com distribuição gama e teste CHISQ ($p < 0,05$). As comparações entre tratamentos e suas interações significativas foram avaliadas por contrastes de Tukey 5%. Por fim, as variáveis que não se adequaram ao modelo ajustado foram tratadas como não paramétricas, e analisadas com o teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As variáveis significativas, salvo aquelas tratadas como não paramétrica, foram submetidas à análise de regressão (*i.e.* linear, quadrática e cúbica). A visualização das semelhanças entre as amostras e as variáveis foram calculadas através da distância euclidiana em análise hierárquica de componentes (HCA) em conjunto com mapas de calor (*HeatMap*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 172 compostos nos tecidos vegetais de erva-mate, destes 160 em folhas e 69 em raízes, apresentados nas Tabelas 17 e 18. Do total de compostos encontrados cerca de 48 % não foram identificados, mas puderam ser detectados e diferenciados (Apêndice D) e todos os espectros estão devidamente catalogados na biblioteca de dados GMD data base (Golm Metabolome Database - <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>).

Entre os metabólitos identificados, destacam-se a predominância dos açúcares em relação aos demais compostos, sendo a sacarose (168) o açúcar mais abundante, tanto em tecido vegetal foliar quanto em raiz (Tabelas 17 e 18). Para o clone IVA 34 existe uma maior concentração de sacarose em folha do que em raiz com o incremento da quantidade de nitrogênio total no sistema de fertirrigação ($p < 0,05$). Dez aminoácidos puderam ser identificados em tecido vegetal foliar e 5 em raiz. Destes a glutamina (26) foi detectada apenas em tecido foliar, bem como a alanina (22) em raiz do clone IVA 34 (Tabelas 17 e 18).

Tanto para o tecido vegetal foliar, quanto para as raízes, o perfil de metabólitos demonstrou que o genótipo é fator importante na distribuição dos compostos na espécie *I. paraguariensis*. A distribuição de alguns metabólitos, nas distintas concentrações de nitrogênio testadas foi diferente entre os clones ($p < 0,05$). Embora existam compostos que somente a dose de N foi importante, independente do clone (genótipo).

Nas Tabelas 17, 18 é visível um maior número de compostos detectados e identificados em tecido foliar, indicando maior complexidade metabólica em folhas quando comparado a raízes. Parte disso ocorre porque a bioquímica do carbono (e.g. glicólise, ciclo do ácido cítrico, rota do chiquimato) está intimamente ligada a fotossíntese, e estas ocorrem nas partes verdes dos vegetais (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010).

TABELA 17: METABÓLITOS ENCONTRADOS E IDENTIFICADOS EM TECIDO FOLIAR DOS DOIS DISTINTOS CLONES TESTADOS IVA 10 (LINHA DE COR BRANCA) E IVA 34 (LINHA DE COR CINZA) E SUA RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA.

															(continua)			
															concentração (µg/g)			
															☐ IVA 10 ■ IVA 34			
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142		
				Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	
1	A194013-101	1938,75	Ácido 3,4-Dihidroxi-hidrocinâmico	3 TMS	179	267	398	32,68	20,31	42,49	45,22	34,83	51,30	38,02	43,96	36,24	34,56	
								36,26	27,00	45,63	40,77	38,86	43,11	39,77	51,14	26,01	58,22	
2	A128003-101	1251,31	Ácido benzóico	1 TMS	105	135	179	42,27	23,37	52,46	13,81	43,85	16,28	46,90	18,59	39,67	20,40	
								47,45	19,06	51,92	32,89	47,38	19,55	49,11	19,24	37,07	18,75	
3	A183004-101	1811,77	Ácido benzóico , 3,4-dihidroxi	3 TMS	193	355	370	27,85	48,57	40,45	40,54	35,58	44,26	32,97	34,19	36,41	35,69	
								31,35	31,36	51,02	44,68	37,97	28,22	37,68	32,32	27,26	44,20	
4	A158007-101	1566,26	Ácido benzóico, 3-hidroxí	2 TMS	267	223	193	27,05	59,78	38,48	54,98	30,41	43,82	32,15	41,51	31,11	35,07	
								31,50	25,32	39,69	41,88	33,90	42,05	39,66	49,86	22,61	38,98	
5	A164003-101	1638,90	Ácido benzóico 4-hidroxí	2 TMS	193	223	267	45,10	16,02	54,87	28,86	40,46	22,33	51,87	16,27	44,22	26,10	
								44,94	19,19	54,55	17,83	53,39	22,18	58,28	29,18	40,73	21,62	
6	A098003-101	972,41	Ácido bórico ^C	3 TMS	221	175	205	33,49	61,70	44,20	9,37	15,84	19,62	26,42	76,22	30,84	55,99	
								16,21	44,23	32,32	21,07	21,59	38,50	19,23	21,17	12,44	39,25	
7	A182004-101	1803,86	Ácido cítrico	4 TMS	255	191	204	4,15	86,07	14,41	72,86	10,86	154,74	6,20	46,11	19,13	113,36	
								3,08	152,70	43,39	78,77	16,22	130,97	18,12	93,19	15,51	51,11	
8	A158010-101	1565,79	Ácido glutárico, 2-hidroxil ^{NT}	3 TMS	129	203	247	5,93	27,86	14,11	44,06	12,56	77,21	12,44	8,25	16,08	16,52	
								5,97	24,41	40,54	81,65	10,75	42,40	15,70	54,98	13,04	24,96	
9	A158004-101	1569,61	2-oxo-Ácido glutárico ^{NT}	1 MEOX 2 TMS	198	126	198	1,35	40,84	1,57	23,65	2,04	29,14	3,00	61,26	2,29	32,38	
								1,58	38,27	1,38	28,30	2,54	31,82	3,25	75,10	1,84	41,71	
10	A106002-101	1062,30	Ácido glicólico ^C	2 TMS	103	133	205	25,97	28,96	27,51	26,48	24,08	16,08	28,70	9,50	28,65	35,24	
								25,51	24,51	41,48	31,88	40,37	45,79	30,42	26,86	30,11	8,88	
11	A105001-101	1045,57	Ácido láctico	2 TMS	117	190	133	24,72	28,88	25,88	22,81	23,84	34,00	39,08	25,09	26,58	34,53	
								27,40	32,45	32,18	53,93	28,98	60,80	40,45	23,56	18,56	26,56	
12	A149001-101	1476,84	Ácido málico	3 TMS	233	189	147	2,99	53,82	9,06	59,79	6,94	52,53	7,89	31,38	9,01	18,42	
								2,80	37,49	22,34	120,61	6,74	41,26	8,39	32,65	10,39	27,24	
13	A113002-101	1118,20	Ácido oxálico	2 TMS	133	190	117	7,74	16,49	21,12	110,62	22,08	89,47	18,57	57,80	7,93	60,71	
								13,67	51,37	21,41	100,75	15,88	24,87	19,77	45,62	13,79	74,37	
14	A108002-101	1074,61	Acido pirúvico	2 TMS	131	189	217	24,24	24,16	30,36	36,76	33,30	24,26	38,79	38,93	31,24	19,95	
								33,24	27,94	37,75	21,23	38,60	19,40	32,09	22,67	28,85	13,55	
15	A185001-101	1844,67	Ácido quínico ^{NT}	5 TMS	255	191	264	10,08	71,77	15,00	60,76	26,81	30,91	30,85	51,79	25,39	76,17	
								10,38	32,98	23,18	71,73	20,93	51,00	30,41	68,76	12,39	24,49	
16	A152003-101	1507,70	Ácido salicílico	2 TMS	267	135	91	28,92	18,05	45,34	33,40	35,99	47,26	40,04	46,68	30,80	46,72	
								32,51	38,49	48,82	43,78	42,73	41,43	44,11	41,60	24,01	35,03	
17	A181002-101	1791,90	Ácido chiquímico ^{NT}	4 TMS	204	255	190	9,48	59,32	7,75	69,43	22,62	47,60	37,19	55,16	19,87	47,98	
								7,82	43,65	12,13	30,99	15,99	41,77	22,12	36,80	13,28	27,49	
18	A134001-101	1309,85	Ácido succínico ^{NT}	2 TMS	247	172	150	26,79	36,78	29,72	29,38	28,39	26,83	39,76	16,13	43,71	7,75	
								24,21	34,37	32,11	19,07	44,19	20,00	39,25	30,24	41,59	20,93	

(continua)

														concentração (µg/g)			
														□ IVA 10 ■ IVA 34			
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142	
				Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
20	A115003-101	1148,62	Álcool benzílico ^{NT}	1 TMS	165	136	166	39,39	15,66	53,71	26,83	47,82	17,99	41,85	11,94	39,76	15,82
								44,53	15,00	50,07	17,20	50,35	20,78	48,89	19,90	32,73	27,95
21	A170009-101	1698,62	Heptadecano ^C		85	99	113	43,33	13,41	41,50	16,12	41,30	12,78	42,82	18,37	40,91	15,90
								46,30	9,50	51,31	29,43	48,76	12,24	49,30	4,55	37,96	10,84
22	A110001-101	1089,32	Alanina	2 TMS	116	17	100	13,11	48,02	15,09	45,69	13,46	37,52	14,57	48,36	20,38	19,87
								10,88	67,07	21,15	79,17	12,48	31,72	14,04	52,45	8,94	21,06
23	A144003-101	1421,22	Ácido aspártico	2 TMS	160	116	161	28,18	43,56	24,28	25,56	18,00	34,07	24,40	34,34	27,23	12,42
								23,43	42,96	44,07	44,76	35,23	48,68	42,26	23,56	32,81	50,59
24	A153003-101	1524,19	Ácido butanóico, 4-amino ^{NT}	3 TMS	174	216	304	5,45	65,02	4,78	62,73	4,82	41,66	4,78	56,38	8,58	54,86
								2,08	31,03	2,28	37,53	3,44	34,37	4,48	20,07	2,50	31,62
25	A163001-101	1620,77	Ácido glutâmico ^{NT}	3 TMS	246	156	128	16,89	49,49	18,88	26,00	16,22	40,68	22,38	45,72	23,39	28,43
								13,73	32,63	32,43	49,31	31,85	34,61	40,56	14,28	34,25	49,15
26	A178001-101	1766,23	Glutamina ^C	3 TMS	156	128	100	ND		ND		ND		ND		ND	
								ND		26,80	97,97	1,12	50,84	1,61	59,30	8,43	28,07
27	A133001-101	1303,05	Glicina ^{NT}	3 TMS	174	248	276	10,04	43,74	12,69	43,66	20,60	51,86	38,09	38,44	21,06	52,12
								22,05	37,86	19,22	22,39	23,52	31,61	21,35	20,44	34,65	47,01
28	A147006-101	1461,78	N-Carboxiglicina ^{INT}	3 TMS	86	218	320	ND		ND		22,03	98,94	16,68	42,21	9,66	52,33
								9,04	37,92	20,70	111,51	13,94	21,83	11,61	13,66	11,30	26,13
29	A157001-101	1555,80	Fenilalanina ^C	1 TMS	120	146	130	8,62	36,56	9,24	23,94	12,46	29,77	18,88	29,16	13,67	12,71
								8,95	24,65	31,13	88,25	16,35	30,08	18,95	46,93	21,76	33,96
30	A153002-101	1521,27	Ácido piro glutâmico ^C	2 TMS	156	170	140	10,74	49,85	14,91	53,60	15,81	40,13	21,44	46,87	20,07	26,66
								16,86	63,63	33,46	56,53	27,31	25,81	30,04	18,56	24,56	30,47
31	A128001-101	1256,12	Serina	2 TMS	116	132	144	31,59	42,77	40,71	34,36	23,40	55,25	39,27	29,68	18,38	31,58
								34,40	8,44	24,02	35,60	23,64	34,64	25,92	55,35	18,74	33,37
32	A132001-101	1296,19	Treonina ^C	2 TMS	130	146	219	17,17	45,38	24,54	29,97	20,30	43,56	18,30	22,75	17,33	15,17
								23,43	41,67	45,08	70,32	34,56	30,85	34,95	37,34	28,75	30,09
33	A223001-101	2214,79	Triptofano ^C	3 TMS	202	218	291	3,85	84,69	4,82	55,67	3,96	81,55	4,05	75,95	15,45	96,34
								0,62	76,20	8,15	77,03	1,30	41,44	1,77	103,79	1,46	36,41
34	A122001-101	1206,36	Valina ^{NT}	2 TMS	144	218	128	3,40	42,15	5,06	35,93	5,76	36,94	3,14	47,34	5,30	24,55
								5,74	78,75	27,13	113,27	4,47	29,29	4,27	38,73	5,06	7,64
35	A104004-101	1052,05	Fenol	1 TMS	151	166	95	32,75	64,51	40,83	42,63	33,40	53,57	31,53	33,80	36,20	38,17
								35,84	35,08	41,42	34,97	29,80	32,93	38,42	52,06	21,67	51,88
36	A205001-101	2045,63	Ácido hexadecanóico	1 TMS	151	166	95	46,45	10,99	42,28	10,71	42,12	11,34	49,16	4,17	40,64	24,41
								46,73	7,43	47,66	22,20	49,87	13,08	52,17	7,58	38,14	11,88
38	A106001-101	1064,09	Ácido hexanóico	1 TMS	117	129	145	43,81	14,49	54,40	17,05	43,21	9,66	46,02	11,00	44,48	20,16
								49,34	5,72	49,18	21,04	52,34	11,99	51,79	9,48	41,25	7,38
39	A225002-101	2242,39	Ácido ocatadecanóico	1 TMS	117	145	131	45,49	7,24	41,40	13,33	41,70	13,40	46,58	7,70	38,98	24,77
								46,40	9,28	45,11	29,28	47,46	10,30	49,67	9,00	36,30	12,47
40	A306002-101	3070,12	Campferol	5 TMS	559	133	560	13,89	48,74	17,48	31,14	27,41	36,90	31,72	35,07	18,37	20,74
								23,59	52,73	28,86	29,15	37,52	25,45	38,41	44,74	31,73	50,56
119	A209001-101	2075,74	Alantoína ^C	3 TMS	259	100	173	9,64	123,97	9,58	68,14	12,33	58,96	6,43	22,77	8,24	33,45
								19,65	64,53	31,76	77,18	33,74	48,35	30,74	54,13	40,90	25,53

(continua)

												concentração (µg/g)									
												□ IVA 10 ■ IVA 34									
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142					
				Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)				
120	A183001-101	1813,50	Arginina [-NH ₃] ^{NT}	3 TMS	157	142	256	ND		6,57	26,59	ND		ND		34,34	55,85				
								ND		ND		ND		ND		12,49	96,75				
121	A185011-101	1875,58	Cafeína ^{NT}		194	109	94	1,59	32,88	6,17	102,87	13,02	69,28	4,61	56,57	8,70	48,47				
								12,96	25,98	16,34	54,67	18,42	30,31	20,15	27,12	36,66	52,63				
122	A128002-101	1259,00	Etanolamina	3 TMS	86	100	174	6,92	18,30	7,15	21,14	6,48	11,83	7,48	10,01	5,94	5,10				
								11,13	18,09	10,79	70,17	11,03	36,39	9,49	22,47	7,71	11,38				
123	A175002-101	1733,81	Putrescina	4 TMS	174	214	142	2,76	57,25	7,46	63,90	1,93	49,58	1,70	78,02	5,00	104,56				
								3,43	72,22	1,32	73,29	1,58	54,09	1,70	79,04	5,61	102,44				
125	A191004-101	1911,42	Tiramina ^{NT}	3 TMS	174	338	130	14,70	70,46	13,62	37,79	17,15	50,85	46,86	25,06	22,01	9,66				
								14,58	44,88	13,48	31,09	17,61	34,04	23,55	21,41	28,80	40,12				
126	A199001-101	1976,68	(Z) Ácido cafeico	3 TMS	220	396	219	30,35	54,63	42,98	31,27	32,49	53,75	30,56	43,89	37,78	18,95				
								34,52	39,39	48,89	51,42	32,09	36,54	36,76	55,19	24,69	52,14				
127	A214001-101	2143,37	(E) Ácido cafeico	3 TMS	219	382	397	38,66	24,17	51,72	33,37	37,82	20,78	42,73	18,28	39,18	26,52				
								44,30	13,12	45,16	21,67	44,85	18,23	53,68	28,34	34,75	31,40				
128	A195001-101	1942,47	(E) Ácido cinâmico, 4-hidroxi	2 TMS	249	293	308	31,12	44,63	36,10	44,84	33,94	33,19	50,37	32,08	37,27	43,01				
								33,45	23,59	43,67	33,84	42,13	40,60	31,57	37,27	27,81	55,64				
129	A156003-101	1557,15	(E) Ácido cinâmico ^{INT}	1 TMS	219	293	249	ND		ND		32,26	40,19	ND		ND					
								18,54	70,80	28,52	41,40	34,19	58,63	34,28	16,34	19,93	39,38				
130	A210001-101	2096,32	(E) Ácido ferúlico	2 TMS	249	308	338	37,50	31,21	47,55	33,56	43,03	34,29	38,54	38,17	43,73	24,18				
								42,25	18,81	49,99	41,78	44,70	28,89	43,89	34,39	36,38	36,23				
131	A299001-101	2969,91	(Z) Ácido 3-cafeiolquínico	6 TMS	345	256	219	23,57	59,45	26,79	23,78	30,85	43,65	33,14	34,78	24,34	15,59				
								27,06	45,92	29,19	26,24	34,07	31,64	34,25	19,51	18,08	8,97				
132	A311001-101	3029,72	(E) Ácido 3-cafeiolquínico ^C	6 TMS	345	256	307	37,00	28,92	37,90	33,27	33,64	28,53	41,51	10,83	35,88	57,55				
								26,83	24,15	25,50	24,13	33,00	28,43	36,19	33,73	23,73	3,64				
133	A317001-101	3152,57	(E) Ácido 4-cafeiolquínico ^{NT}	6 TMS	373	484	447	36,65	46,83	41,32	31,37	20,17	55,50	23,78	29,45	23,58	58,10				
								20,09	47,84	29,98	53,24	23,04	36,10	20,82	28,51	17,83	16,90				
134	A301002-101	2987,47	(Z) Ácido 5-cafeiolquínico	6 TMS	307	345	147	21,70	20,00	31,99	25,77	33,93	35,49	33,99	39,48	27,57	6,09				
								35,23	43,52	32,15	41,71	43,88	30,62	38,64	18,30	27,38	15,90				
135	A319001-101	3093,64	(E) Ácido 5-cafeiolquínico	6 TMS	357	255	447	27,58	25,62	29,00	28,70	33,12	39,48	32,98	22,48	25,30	42,93				
								33,14	33,35	24,39	69,79	46,80	27,00	41,16	44,34	36,39	12,80				
136	A233002-101	2303,35	Glicose-6-fosfato	1 MEOX 6 TMS	387	299	160	31,48	29,99	32,85	15,69	40,25	31,96	35,08	18,16	24,16	30,36				
								38,84	20,70	44,12	35,63	33,62	40,13	31,44	32,53	31,54	27,52				
137	A181003-101	1790,57	Ácido glicérico-3-fosfato ^{NT}	4 TMS	299	227	315	ND		ND		15,34	33,13	45,40	38,20	ND					
								ND		ND		18,96	30,17	ND		15,37	17,48				
138	A129001-101	1262,81	Ácido fosfórico ^C	3 TMS	299	193	283	9,50	97,40	24,62	91,99	16,00	62,43	15,35	64,52	13,00	50,16				
								5,77	50,36	14,76	87,72	5,71	54,12	7,41	76,89	8,91	26,77				
139	A119001-101	1166,16	Ácido fosfórico monometil ester	2 TMS	163	211	243	19,64	98,00	19,36	25,67	30,52	65,55	27,90	40,10	20,56	33,25				
								21,56	43,93	23,89	63,01	16,17	43,82	15,99	46,89	20,14	21,76				
140	A154001-101	1527,83	Ácido eritrônico ^{NT}	4 TMS	217	205	292	15,18	36,78	32,64	28,56	20,18	55,91	22,72	41,23	34,68	6,62				
								9,06	38,62	46,00	56,87	23,53	52,55	19,71	37,45	26,39	13,99				
141	A204001-101	2028,25	Ácido galactárico	6 TMS	143	189	334	17,80	29,61	35,97	32,63	20,74	54,63	18,53	22,32	22,89	27,46				
								13,06	75,83	38,72	56,89	20,22	34,13	35,52	85,11	19,11	35,33				

(continua)

														concentração (µg/g)									
														☐ IVA 10 ■ IVA 34									
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142							
				Grupos adicionais		Fragmentos (m/z)		media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)						
142	A199002-101	1978,98	Ácido galactônico ^C	6 TMS	103	129	204	7,18	53,97	12,45	80,03	11,97	121,58	7,93	4,75	6,36	14,44						
								11,00	135,43	36,70	84,32	13,50	108,91	11,06	15,06	12,43	2,93						
143	A200001-101	1983,86	Ácido glucônico ^{NT}	6 TMS	319	189	205	ND		8,88	104,51	3,67	24,33	5,99	55,21	ND							
								ND		14,03	81,29	6,97	57,00	ND		ND							
144	A135003-101	1320,19	Ácido glicérico	3 TMS	133	205	292	36,00	21,42	31,46	46,75	20,00	24,65	35,72	47,20	45,39	39,62						
								30,78	50,14	24,99	41,25	29,15	23,51	26,81	36,40	33,13	25,88						
145	A178005-101	1758,00	Ácido lioxônico	5 TMS	292	213	133	12,31	45,09	17,55	49,49	18,69	91,67	17,66	27,21	13,62	10,08						
								12,75	99,93	41,04	78,79	19,80	71,91	16,08	25,90	13,89	27,07						
146	A177001-101	1747,92	Ácido ribônico ^{NT}	5 TMS	204	292	305	12,42	20,46	18,88	35,05	19,20	57,34	19,50	33,64	20,63	16,81						
								13,81	19,66	37,82	76,14	19,71	31,25	17,55	24,52	17,15	5,73						
147	A201001-101	1997,76	Ácido sacárico	6 TMS	333	143	292	3,59	21,93	5,47	24,65	5,83	102,84	3,86	12,30	3,96	19,93						
								3,24	72,09	10,21	59,22	4,47	52,08	4,50	25,85	3,95	19,07						
148	A156001-101	1545,31	Ácido treônico	4 TMS	205	292	117	20,00	24,10	15,46	56,31	9,34	33,07	17,81	55,67	17,10	49,86						
								10,21	37,57	29,26	49,64	18,35	67,42	25,50	41,91	36,52	37,61						
149	A140005-101	1373,74	Ácido treônico, 1,4-lactona ^C	2 TMS	103	101	217	11,82	23,37	18,43	42,20	14,72	41,46	12,92	15,95	20,84	39,71						
								16,43	42,08	34,97	54,29	25,14	31,29	21,84	49,04	27,98	18,14						
150	A171012-101	1709,79	Arabitol ^{NT}	5 TMS	205	217	319	10,27	36,64	19,21	53,82	22,90	20,79	24,32	13,62	20,86	30,56						
								24,57	18,33	24,82	33,56	27,39	27,79	31,51	22,61	39,81	32,87						
151	A150002-101	1490,47	Eritritol ^C	4 TMS	117	205	217	ND		ND		ND		ND		ND							
								ND		7,36	37,78	22,88	94,08	ND		4,22	0,68						
152	A129003-101	1261,17	Glicerol ^{NT}	3 TMS	205	217	129	24,25	25,10	36,03	50,43	20,06	17,77	24,84	12,10	19,96	18,87						
								42,44	46,09	27,54	27,73	31,83	53,71	35,19	23,73	17,90	16,86						
153	A140012-101	1400,84	Hidroquinona	2 TMS	254	239	112	31,16	60,43	41,88	36,58	32,05	30,87	35,35	34,92	40,68	32,00						
								38,31	34,18	48,59	41,99	39,93	39,98	40,79	35,60	29,04	45,73						
154	A189011-101	1877,54	allo-Inositol ^C	6 TMS	318	432	434	25,17	17,93	26,81	25,28	31,45	23,65	35,23	13,13	28,23	27,44						
								34,48	21,89	37,87	37,35	36,55	30,90	36,63	35,26	42,67	9,00						
155	A209002-101	2080,18	mio-Inositol ^{INT}	6 TMS	318	432	217	33,36	28,04	31,85	15,87	27,84	23,57	24,94	25,46	35,19	30,90						
								31,93	28,50	26,28	39,39	40,76	10,43	39,23	20,12	47,98	12,72						
156	A193002-101	1908,89	Manitol ^{INT}	6 TMS	205	217	319	ND		6,91	27,04	ND		8,79	54,97	5,83	13,58						
								ND		5,78	27,66	ND		ND		ND							
157	A299002-101	2923,54	Galactinol ^C	9 TMS	204	217	191	9,75	87,59	5,62	40,39	7,01	69,91	6,23	27,49	5,34	23,31						
								11,70	77,69	15,22	124,25	21,65	103,84	7,77	25,34	16,60	28,94						
158	A167002-101	1649,16	Arabinose ^{NT}	1 MEOX 4 TMS	217	189	205	2,46	60,31	2,51	67,86	8,80	60,56	17,94	15,20	10,23	95,11						
								8,60	82,94	4,51	88,74	11,67	87,89	18,41	174,54	13,80	80,39						
159	A187002-101	1854,66	Frutose	1 MEOX 5 TMS	217	307	191	6,10	36,29	7,99	30,01	5,09	27,58	6,08	43,65	6,21	54,35						
								5,93	42,43	11,00	113,38	6,79	58,19	7,61	63,32	7,77	15,10						
160	A173002-101	1710,23	Fucose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS	117	160	217	ND		ND		15,77	29,01	17,03	21,60	26,12	39,80						
								39,61	21,93	18,11	24,20	37,74	42,01	31,99	43,16	37,67	26,57						
161	A188001-101	1871,53	Galactose ^{NT}	1 MEOX 5 TMS	205	217	157	9,58	38,83	14,38	20,26	15,08	33,14	16,56	26,10	24,04	48,51						
								16,66	51,03	22,81	78,35	17,31	42,11	17,05	61,50	29,65	62,79						
162	A191001-101	1898,08	Glicose	1 MEOX 5 TMS	204	117	130	7,00	49,70	9,28	22,54	10,37	54,46	13,41	72,96	20,22	60,05						
								7,44	73,07	13,53	95,23	6,98	76,30	15,05	140,57	8,68	26,46						

(conclusão)

												concentração (µg/g)											
												☐ IVA 10 ■ IVA 34											
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)			144		206		380		761		1142								
				Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)						
163	A172001-101	1699,34	β-Glicose, 1,6-anidro ^C	3 TMS	204	117	143	25,79	22,27	32,18	21,25	25,07	10,44	22,76	25,46	28,68	22,48						
								31,72	37,05	44,13	21,36	34,31	16,29	33,41	18,70	28,14	12,64						
164	A274001-101	2715,90	Maltose ^C	1 MEOX 8 TMS	361	319	217	9,13	36,44	9,76	39,32	9,34	31,22	6,95	19,96	6,99	42,60						
								10,00	30,42	21,70	125,48	15,93	18,48	11,54	32,17	15,14	19,37						
165	A188002-101	1866,01	Manose	1 MEOX 5 TMS	319	217	205	4,44	57,23	5,90	40,61	8,71	18,18	10,78	19,18	12,08	52,02						
								8,04	53,05	11,49	49,98	8,07	54,84	14,28	114,37	21,53	86,55						
166	A337002-101	3341,68	Rafinose	11 TMS	205	217	191	25,61	47,80	34,57	33,98	29,79	37,48	24,89	39,38	29,74	28,16						
								42,59	37,56	17,90	56,16	36,78	52,26	36,07	29,70	35,48	23,21						
167	A168002-101	1663,85	Ribose ^C	1 MEOX 4 TMS	361	217	319	29,95	44,74	44,63	16,02	37,38	30,40	51,99	8,24	41,00	38,67						
								23,41	37,25	33,70	17,82	26,29	32,34	27,11	45,25	28,26	16,72						
168	A264001-101	2621,81	Sacarose ^{INT}	8 TMS	217	361	271	38,96	23,20	44,83	26,14	29,17	31,20	30,22	29,57	37,11	33,33						
								30,64	20,32	38,74	30,75	43,44	17,43	42,16	40,54	48,62	14,71						
169	A274002-101	2723,10	α,α -Trealose	8 TMS	361	243	271	6,85	37,95	12,73	72,26	7,10	44,83	17,00	82,83	8,49	22,47						
								9,22	42,20	13,18	46,24	13,34	56,73	10,95	52,10	8,60	41,53						
170	A165001-101	1641,97	Xilose ^{INT}	1 MEOX 4 TMS	217	189	307	4,54	65,90	7,94	59,12	7,96	29,92	11,42	34,41	8,38	54,18						
								11,08	46,33	23,30	114,38	12,98	65,47	10,59	77,64	8,74	32,00						

Análise estatística INT- variável com interação, diferenças entre clone e dosagem de nitrogênio, NT – metabólito com diferença apenas entre as doses de nitrogênio; C – metabólito com diferença entre os clones, mas não entre as doses de nitrogênio. Os compostos sem marcação em subscrito não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Para os açúcares redutores foi considerado apenas o maior pico encontrado, via de regra o isômero E.

TABELA 18: METABÓLITOS ENCONTRADOS E IDENTIFICADOS EM RAÍZ DOS DOIS DISTINTOS CLONES TESTADOS IVA 10 (LINHA DE COR BRANCA) E IVA 34 (LINHA DE COR CINZA) E SUA RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA

(Continua)

														concentração (µg/g)					
														☐ IVA 10 ■ IVA 34					
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)						144		206		380		761		1142	
				Grupos adicionais		Fragmentos (m/z)				media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
2	A128003-101	1251,31	Ácido benzóico ^{INT}	1 TMS	105	135	179	46,35	61,29	32,98	14,15	34,45	15,87	27,86	6,10	21,78	13,62		
								24,45	18,98	24,23	12,84	35,67	50,40	23,28	16,73	21,20	16,21		
4	A158007-101	1566,26	Ácido benzóico, 3-hidoxi	2 TMS	267	223	193	51,76	24,06	22,89	10,33	45,58	25,46	36,58	43,74	29,30	46,99		
								35,92	53,07	37,37	29,38	45,53	19,13	34,77	31,09	35,68	31,81		
5	A164003-101	1638,90	Ácido benzóico 4-hidroxi	2 TMS	193	223	267	45,96	25,58	21,72	13,37	36,17	21,14	31,50	44,58	27,88	56,50		
								33,10	67,21	28,51	55,96	47,70	28,74	34,45	31,07	34,25	30,71		
7	A182004-101	1803,86	Ácido cítrico ^C	4 TMS	255	191	204	41,28	31,22	5,59	78,95	19,57	34,39	34,71	15,97	14,63	71,05		
								26,74	51,27	32,05	15,94	47,39	15,53	35,70	43,02	52,66	26,14		
11	A105001-101	1045,57	Ácido láctico ^C	2 TMS	117	190	133	23,78	23,89	10,80	24,79	15,17	46,24	10,53	35,53	22,03	58,36		
								40,19	40,39	24,24	39,38	28,97	70,31	18,95	74,68	38,86	26,13		
12	A149001-101	1476,84	Ácido málico ^{INT}	3 TMS	233	189	147	32,78	18,65	12,08	88,46	30,18	31,02	39,50	24,54	15,43	50,19		
								16,99	38,67	17,93	21,17	25,04	21,12	23,01	33,39	37,86	15,20		
15	A185001-101	1844,67	Ácido quínico ^{INT}	5 TMS	255	191	264	14,44	54,36	8,38	28,97	29,58	67,70	8,70	16,68	5,87	36,35		
								26,88	30,02	27,45	49,66	28,40	60,65	10,45	50,03	15,57	50,35		
18	A134001-101	1309,85	Ácido succínico ^{INT}	2 TMS	247	172	150	29,58	19,73	ND		29,03	13,06	31,47	9,42	25,11	19,98		
								ND		ND		33,79	45,60	22,37	10,12	35,98	31,58		
19	A118003-101	1180,54	Ácido succínico semialdeído	1 MEOX 1 TMS	86	89	113	6,98	66,54	22,14	155,97	4,12	39,09	2,74	32,29	6,03	44,64		
								8,86	63,60	9,55	99,60	19,75	71,29	3,22	28,18	5,99	59,38		
20	A115003-101	1148,62	Álcool benzílico ^{INT}	1 TMS	165	136	166	59,86	6,35	66,36	11,36	65,18	10,25	38,67	4,43	34,83	5,91		
								30,70	11,83	29,27	16,29	34,99	15,00	34,95	20,91	26,47	21,44		
21	A170009-101	1698,62	Heptadecano		85	99	113	50,44	17,53	46,64	8,90	38,46	11,78	38,76	9,01	39,85	1,77		
								47,21	33,93	38,02	15,60	54,00	47,16	39,68	10,56	35,59	14,68		
22	A110001-101	1089,32	Alanina ^C	2 TMS	116	17	100	ND		ND		ND		ND		ND			
								25,13	90,12	18,36	9,23	80,09	93,08	ND		23,39	39,31		
23	A144003-101	1421,22	Ácido aspártico ^C	2 TMS	160	116	161	2,59	67,77	1,85	34,21	1,10	18,61	1,13	27,52	3,08	61,72		
								8,02	161,12	9,73	125,44	22,14	79,78	9,59	77,47	6,74	35,14		
24	A153003-101	1524,19	Ácido butanóico, 4-amino ^C	3 TMS	174	216	304	5,99	62,89	0,65	29,17	3,96	65,21	5,80	58,38	11,75	62,30		
								23,27	48,73	13,22	116,20	35,80	22,99	8,30	93,42	17,46	56,20		
25	A163001-101	1620,77	Ácido glutâmico	3 TMS	246	156	128	9,36	20,75	ND		7,75	8,48	6,17	11,88	9,93	62,10		
								ND		10,71	48,96	15,02	46,95	ND		19,08	74,98		
27	A133001-101	1303,05	Glicina	3 TMS	174	248	276	ND		ND		2,01	12,14	ND		ND			
								1,50	22,12	ND		5,50	68,95	ND		ND			
30	A153002-101	1521,27	Ácido piroglutâmico	2 TMS	156	170	140	3,06	22,82	ND		7,62	37,04	5,01	44,28	4,27	63,01		
								4,31	86,73	4,62	61,42	12,35	43,58	6,75	51,39	6,71	47,43		
31	A128001-101	1256,12	Serina	2 TMS	116	132	144	10,12	88,67	8,50	45,36	14,24	35,53	9,27	51,24	5,44	44,34		
								14,59	33,02	11,16	84,06	26,71	65,77	9,45	64,03	12,46	89,46		

(Continua)

															concentração (µg/g)				
															☐ IVA 10 ■ IVA 34				
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)						144		206		380		761		1142	
				Grupos adicionais		Fragmentos (m/z)				media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
36	A205001-101	2045,63	Ácido hexadecanóico	1 TMS	151	166	95	55,64	15,74	51,99	13,57	48,12	4,83	47,49	11,35	50,98	9,67		
								53,95	23,48	46,88	8,57	61,70	47,68	49,97	12,81	47,13	4,92		
39	A225002-101	2242,39	Ácido ocatadecanóico ^{INT}	1 TMS	117	145	131	37,96	12,75	36,41	19,40	34,94	11,19	46,42	11,69	50,11	13,03		
								51,94	26,31	44,09	10,34	62,42	49,82	47,59	13,20	47,17	2,54		
122	A128002-101	1259,00	Etanolamina ^{NT}	3 TMS	86	100	174	34,17	16,80	37,94	10,18	39,11	10,96	36,25	9,82	25,06	26,93		
								35,70	19,92	26,35	19,18	34,40	12,58	30,78	20,29	23,24	49,06		
127	A214001-101	2143,37	(E) Ácido cafeico	3 TMS	219	382	397	47,95	66,02	25,23	54,83	26,53	43,34	25,55	43,94	24,83	65,47		
								35,74	44,02	18,61	53,13	39,13	46,71	22,64	41,94	22,74	71,07		
131	A299001-101	2969,91	(Z) Ácido 3-cafeiolquinico ^{NT}	6 TMS	345	256	219	6,47	28,87	11,92	85,45	9,04	17,46	4,99	21,68	13,89	107,08		
								38,37	61,93	15,81	48,32	16,91	45,84	9,30	60,73	11,80	24,10		
132	A311001-101	3029,72	(E) Ácido 3-cafeiolquinico ^C	6 TMS	345	256	307	3,93	55,43	17,02	105,20	10,63	100,38	1,30	91,06	13,79	132,99		
								41,65	57,95	19,01	82,89	15,33	55,05	9,55	92,05	9,11	68,83		
133	A317001-101	3152,57	(E) Ácido 4-cafeiolquinico ^{INT}	6 TMS	373	484	447	1,47	29,00	9,84	124,02	2,69	87,97	0,84	45,27	13,65	75,47		
								31,39	85,65	8,21	127,77	4,33	61,84	4,91	66,08	4,30	109,99		
134	A301002-101	2987,47	(Z) Ácido 5-cafeiolquinico	6 TMS	307	345	147	12,94	21,81	19,24	46,46	13,12	17,41	9,55	10,53	27,69	82,68		
								32,65	51,32	17,19	40,00	54,95	105,24	13,04	31,23	15,72	30,86		
135	A319001-101	3093,64	(trans) Ácido 5-cafeiolquinico ^C	6 TMS	357	255	447	2,36	25,73	8,69	109,37	3,12	74,20	3,71	26,64	15,18	90,83		
								29,39	77,61	9,68	114,42	5,49	35,17	4,60	37,35	4,91	71,27		
138	A129001-101	1262,81	Ácido fosfórico ^{INT}	3 TMS	299	193	283	19,26	65,21	44,26	46,84	32,31	59,33	9,10	124,22	16,48	25,98		
								9,72	97,92	17,02	115,75	16,22	53,86	4,16	96,22	4,96	63,96		
139	A119001-101	1166,16	Ácido fosfórico monometil ester ^C	2 TMS	163	211	243	21,31	31,96	26,44	19,51	22,50	12,71	28,48	54,26	52,77	12,25		
								20,74	24,34	26,43	32,76	58,37	68,47	12,91	14,67	ND			
140	A154001-101	1527,83	Ácido eritrônico ^{INT}	4 TMS	217	205	292	65,71	29,86	ND		26,95	12,88	30,23	27,85	ND			
								ND		ND		ND		ND		ND			
141	A204001-101	2028,25	Ácido galactárico	6 TMS	143	189	334	34,67	7,82	ND		23,20	10,66	27,23	18,95	ND			
								18,77	12,54	39,54	29,91	44,71	67,94	ND		ND			
144	A135003-101	1320,19	Ácido glicérico	3 TMS	133	205	292	24,33	16,03	ND		26,25	11,85	23,82	10,82	23,29	2,06		
								25,39	25,33	ND		28,20	63,08	24,37	7,67	25,03	8,34		
148	A156001-101	1545,31	Ácido treônico ^{INT}	4 TMS	205	292	117	63,71	24,47	ND		36,34	36,07	25,58	34,42	ND			
								15,68	6,14	ND		ND		20,43	19,33	36,50	22,08		
152	A129003-101	1261,17	Glicerol ^{INT}	3 TMS	205	217	129	60,09	36,23	40,79	12,53	32,00	7,20	19,77	4,33	17,92	9,18		
								18,26	20,30	16,86	6,80	23,04	37,68	17,62	14,66	15,26	2,44		
155	A209002-101	2080,18	mio-Inositol ^{INT}	6 TMS	318	432	217	15,44	30,15	14,05	42,74	24,91	21,75	12,06	4,66	18,19	15,81		
								36,68	13,95	25,15	54,02	27,03	49,14	13,29	46,52	37,42	49,65		
156	A193002-101	1908,89	Manitol	6 TMS	205	217	319	36,44	46,98	14,05	38,93	24,04	41,40	14,14	30,71	23,93	39,52		
								16,62	99,97	28,49	84,62	17,28	66,36	20,93	50,51	10,52	32,64		

(Conclusão)

														concentração (µg/g)			
														☐ IVA 10 ■ IVA 34			
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142	
				Grupos adicionais	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
157	A299002-101	2923,54	Galactinol ^{INT}	9 TMS	204	217	191	41,20	49,33	23,79	45,58	17,61	73,51	9,34	63,05	16,02	84,62
								39,64	33,74	30,84	33,13	20,61	44,31	29,73	45,81	43,43	33,61
159	A187002-101	1854,66	Frutose	1 MEOX 5 TMS	217	307	191	19,38	94,57	6,01	51,05	19,69	51,34	15,70	57,52	25,67	98,38
								25,70	26,02	16,22	31,08	10,70	29,95	8,02	46,18	19,13	65,41
163	A172001-101	1699,34	β-Glicose, 1,6-anidro ^{NT}	3 TMS	204	117	143	59,24	34,79	37,44	17,38	44,32	26,70	39,55	15,23	34,75	45,59
								55,12	8,76	44,16	15,11	38,42	15,60	30,35	32,01	31,91	11,42
164	A274001-101	2715,90	Maltose ^C	1 MEOX 8 TMS	361	319	217	ND		ND		ND		ND		ND	
								7,43	30,02	18,97	19,84	18,17	70,85	ND		7,30	21,48
166	A337002-101	3341,68	Rafinose ^{INT}	11 TMS	205	217	191	21,07	52,04	16,44	92,01	11,08	17,59	24,25	37,98	18,22	49,80
								33,14	46,90	16,33	39,87	10,98	58,17	7,62	22,61	8,53	18,37
168	A264001-101	2621,81	Sacarose	8 TMS	217	361	271	48,53	22,04	39,00	35,50	52,51	15,45	45,41	7,19	46,29	26,05
								56,29	14,04	48,16	7,79	54,57	23,52	41,47	25,97	56,66	9,88
169	A274002-101	2723,10	α,α -Trealose ^{NT}	8 TMS	361	243	271	22,68	52,15	12,68	76,94	15,30	54,20	5,72	14,16	4,22	63,60
								8,96	63,39	12,12	61,03	32,24	121,56	7,54	44,89	4,67	12,57
171	A177004-101	1753,94	Glucopiranose [-H ₂ O] ^{NT}	4 TMS	217	219	191	39,87	45,60	47,42	55,20	27,54	17,32	24,35	17,67	13,94	2,75
								29,56	23,76	23,57	23,06	30,52	47,62	25,82	60,80	19,48	22,73
172	A189002-101	1877,29	Glicose	1 MEOX 5 TMS	217	205	191	66,63	16,14	60,17	11,41	57,42	8,23	54,59	8,27	48,23	18,43
								57,49	9,72	52,89	5,15	63,31	38,14	47,30	11,60	51,37	7,61

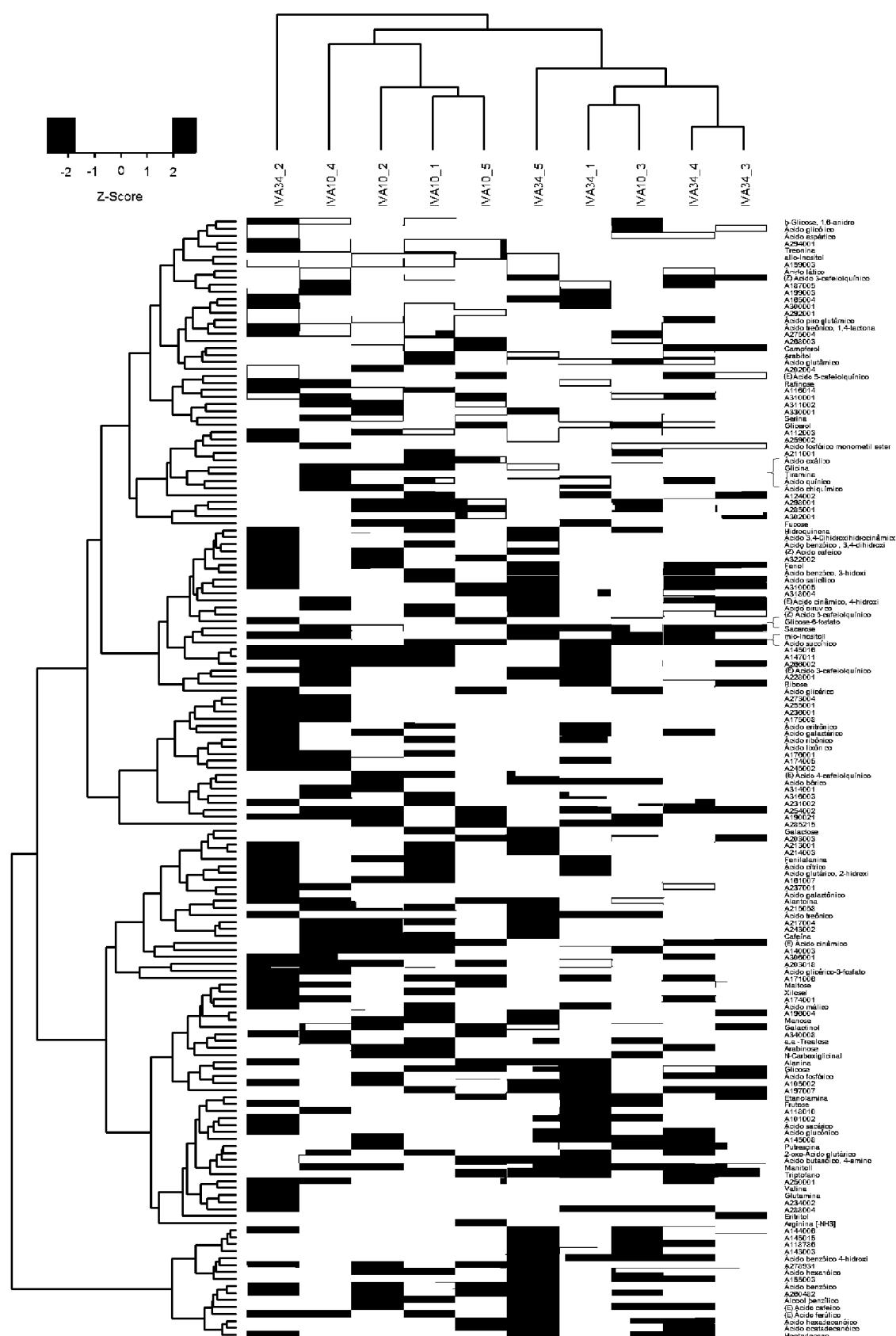
Análise estatística INT- variável com interação, diferenças entre clone e dosagem de nitrogênio, NT – metabólito com diferença apenas entre as doses de nitrogênio; C – metabólito com diferença entre os clones, mas não entre as doses de nitrogênio. Os compostos sem marcação em subscrito não apresentaram diferenças significativas (p> 0,05). Para os açúcares redutores foi considerado apenas o maior pico encontrado, via de regra o isômero E.

Para melhor visualizar os dados a análise hierárquica de componentes (HCA) foi realizada juntamente com um mapa de calor (*'HeatMap'*), gerando um gráfico multi-informativo em que o padrão de agrupamento existente entre as amostras (colunas) com relação aos metabólitos (linhas), puderam ser visualizados. O escore Z (*'z-score'*) representa o valor de expressão dos metabólitos, escalado, de cada amostra, e foram plotados nas escalas de cores azul-vermelho, onde a cor vermelha na linha indica alta abundância dos metabólitos e azul indica baixa.

No mapa de calor é possível ver que existem 2 grupos distintos de amostras para tecido foliar, e uma anomalia formada pelas amostras do clone IVA 34 coletados na solução nutritiva 2 (206 mg L⁻¹ de N total) (Figura 45). Os dois grupos existentes (Figura 45) são provenientes do agrupamento e separação das amostras do clone IVA 10 das do clone IVA 34, com exceção das amostras de IVA 10 coletadas na solução 3 (380 mg L⁻¹ de N total), demonstrando que o genótipo é um importante fator na distribuição dos metabólitos. No geral, as maiores concentrações de metabólitos são vistas no clone IVA 34 nas soluções intermediárias de nitrogênio, soluções 2 – 4 (coloração em vermelho, Figura 45).

Em raiz é possível observar padrão semelhante no agrupamento das amostras, onde dois grupos podem ser observados, o primeiro formado pelas três soluções com menor teor de nitrogênio para o clone IVA 10, o segundo pelas demais amostras, com exceção das amostras anômalas coletadas na solução intermediária 3 em clone IVA 34 (Figura 46).

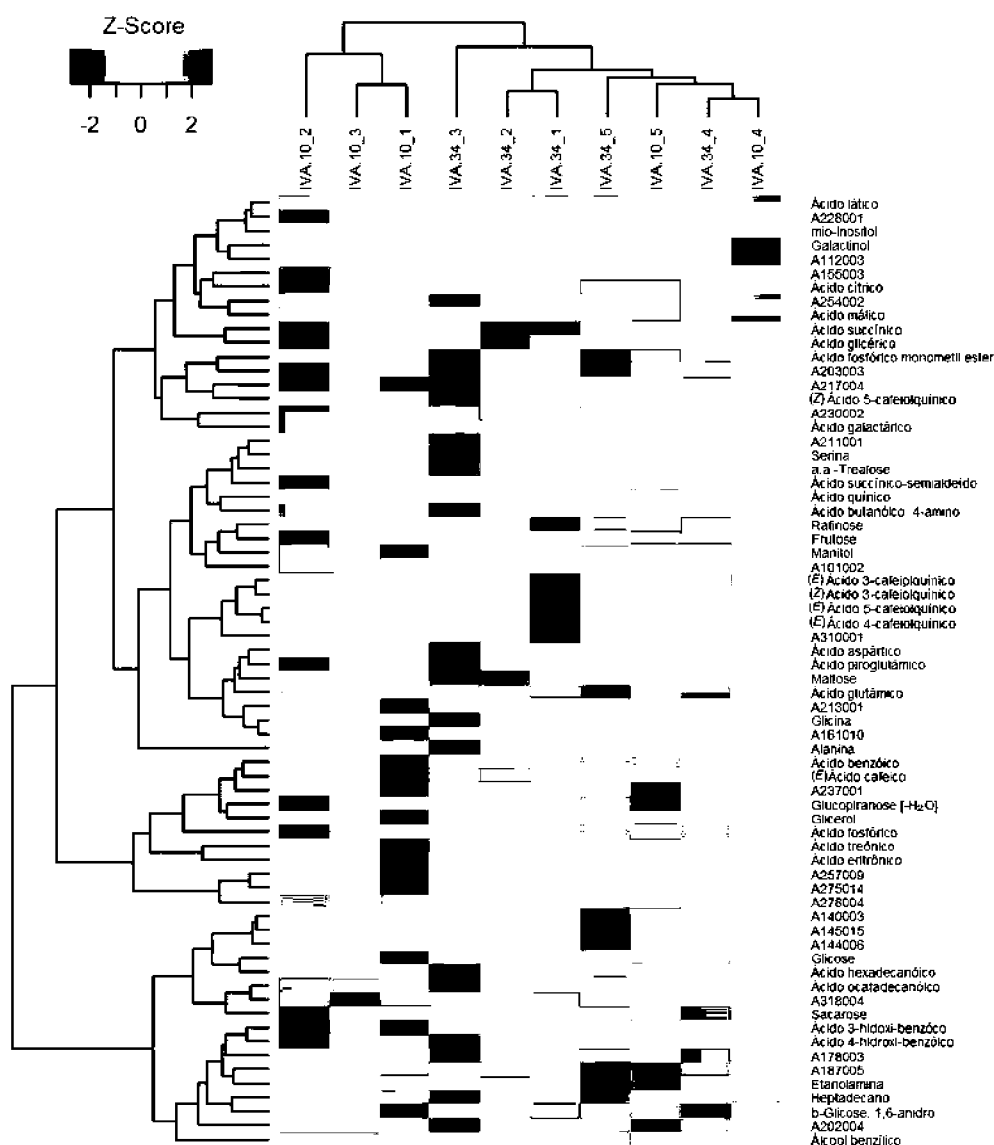
FIGURA 45: MAPA DE CALOR DE TECIDO FOLIAR FRENTE A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO



Nota: Nota: Números 1-5 referem-se às dosagens de nitrogênio (144 a 1142 mg L⁻¹) usadas em sistema de fertirrigação, da menor para maior quantidade, respectivamente.

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 46: MAPA DE CALOR DE RAÍZES FRENTE A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO



Nota: Números 1-5 referem-se às dosagens de nitrogênio (144 a 1142 mg L⁻¹) usadas em sistema de fertirrigação, da menor para maior quantidade, respectivamente.

FONTE: O autor (2018).

Com relação à distribuição dos metabólitos para tecido foliar (Figura 45), é possível observar o agrupamento aminoácido fenilalanina, cafeína e ácido cítrico, sendo que o maior z-score de cafeína é vista em clone IVA 34 em dose elevadas de N (coloração em vermelho). Para os ácidos clorogênicos, de forma geral, os estereoisômeros Z apresentaram menores quantidades em clone IVA 34 (cores em azul), em comparação com os estereoisômeros E (cores em vermelho).

Na raiz é nítida, no mapa de calor (Figura 46), o agrupamento dos ácidos málico, cítrico, succínico e glicérico, com maiores z-score destes para clone IVA 34. Os ácidos clorogênicos apresentam-se próximos matematicamente, com menores valores de z-score destes compostos vistas em clone IVA 10. Para clone IVA 34, as maiores quantidades dos ácidos clorogênicos são observadas na menor concentração de N total utilizado (solução 1). O padrão de agrupamentos, demonstrados em tecido foliar no mapa de calor da Figura 45, sugere que o genótipo é fator mais importante no agrupamento de amostras, separação entre clones IVA 10 e IVA 34 que as doses de N total. Entretanto, nas raízes, o contrário é encontrado (Figura 46), no qual a concentração de N total tem maior influência na distribuição das amostras (i.e. separação entre as doses de N) principalmente para IVA 10. Os diferentes padrões de agrupamento (doses em raiz e clones em folhas) pode ser um reflexo da função de cada tecido. A atividade fotossintética na folha pode ser um diferencial entre os clones, a glicose-6-fostato (136) associada ao fluxo de carbono a partir da fotossíntese na geração de sacarose (168), e consequente formação de paredes celular (MEYER *et al.*, 2007) (Tabela 17, Figura 45), estão próximos no mapa de calor com z-scores maiores para o clone IVA34, indicando um maior potencial de produção de biomassa para este clone. Já para raízes, a dose de N é mais importante no agrupamento do que o efeito clone, uma vez que a fixação do N e mudanças nas soluções nutritivas, com respeito à dose de N total, podem acarretar alterações no metabolismo no tecido radicular.

Embora o uso de mapas de calor ajude a interpretação dos dados (e.g. agrupamentos), esses não são suficientes para o entendimento dos processos e padrões de respostas dos metabólitos individualmente. Assim, foi realizada análises estatísticas dos dados individualizados, sendo aqueles relevantes submetidos à análise de regressão em relação à dosagem crescente de N (concentrações de 144 a 1142 mg L⁻¹) (Tabela 19). O objetivo da análise de regressão foi encontrar um modelo que prevê estatisticamente ($p < 0,05$) a melhor forma de distribuição de uma variável resposta (metabólitos) em relação a variável explicativa (concentração de N) (WERKEMA; AGUIAR, 1996, HAIR JR. *et al.*, 2005). No trabalho foram testados somente os modelos de regressão linear, quadrática e cúbica, por entender que esses exemplifiquem uma quantidade significativa de compostos que apresentam variação entre dosagem (NT) ou dosagem e clone (NT x Clone) (Tabela 19).

TABELA 19: ANÁLISE DE REGRESSÃO DOS METABÓLITOS PARA OS CLONES IVA 10 E IVA 34 NOS DISTINTOS TECIDOS VEGETAIS (FOLHA E RAIZ).

□ IVA 10 IVA 34								
Tecido Foliar								
ID	Nome	Interação	Variável	Intervalo	Modelo	Equação da reta	R ²	p
9	2-oxo-Ácido glutárico	não	NT		ns			
17	Ácido chiquímico	não	NT	7,75 - 37,19	quadrático	$-2,52 + 8,051 \cdot 10^{-2} x - 5,57 \cdot 10^{-5} x^2$	0,9779	< 0,001
18	Ácido succínico	não	NT	24,21 - 44,19	linear	$26,99 + 0,015 x$	0,8334	< 0,01
20	Álcool benzílico	não	NT	11,94 - 53,71	quadrático	$40,236 + 2,90 \cdot 10^{-2} x - 3,081 \cdot 10^{-5} x^2$	0,9992	< 0,05
24	Ácido butanóico, 4-amino	não	NT		ns			
25	Ácido glutâmico	não	NT	13,73 - 34,25	linear	$18,064 + 0,142 x$	0,9810	< 0,01
27	Glicina	não	NT	10,04 - 34,65	linear	$13,045 + 0,0176 x$	0,9814	< 0,01
34	Valina	não	NT		ns			
121	Cafeína	não	NT	1,59 - 36,60	linear	$7,38 + 0,0128 x$	0,7285	< 0,05
125	Tiramina	não	NT	14,70 - 46,86	cúbico	$20,42 - 0,0883 x + 2,548 \cdot 10^{-4} x^2 - 1,531 \cdot 10^{-7} x^3$	0,9898	< 0,05
133	(E) Ácido 4-cafeioiquínico	não	NT	17,83 - 41,32	linear	$31,03 - 0,0104 x$	0,9856	< 0,05
150	Arabitol	não	NT	10,27 - 39,81	linear	$17,85 + 0,0135 x$	0,9892	< 0,01
152	Glicerol	não	NT	17,90 - 42,44	linear	$34,298 - 0,0117 x$	0,9935	< 0,01
161	Galactose	não	NT		ns			
165	Manose	não	NT	4,44 - 21,53	linear	$5,437 + 0,0098 x$	0,9174	< 0,01
155	<i>mio</i> -Inositol	sim	INT	26,28 - 47,98	linear	$28,19 + 0,017 x$	0,7192	< 0,001
168	Sacarose	sim	INT		ns			
170	Xilose	sim	INT		ns			
Raízes								
122	Etanoamina	não	NT	23,24 - 39,11	linear	$37,41 - 0,0097 x$	0,9956	< 0,01
131	(Z) Ácido 3-cafeioiquínico	não	NT	4,99 - 38,37	quadrático	$26,67 - 0,052 x + 3,31 \cdot 10^{-5} x^2$	0,9302	< 0,01
169	α, α -Trealose	não	NT	4,22 - 32,24	linear	$18,714 - 0,0127 x$	0,9338	< 0,01
2	Ácido benzóico	sim	INT		ns			
12	Ácido málico	sim	INT	16,99 - 37,42	linear	$14,288 + 0,0179 x$	0,8284	< 0,001
20	Álcool benzílico	sim	INT	34,83 - 66,36	cúbico	$27,19 + 0,0178 x + 3,558 \cdot 10^{-6} x^2 - 1,727 \cdot 10^{-8} x^3$	0,9998	< 0,01
152	Glicerol	sim	INT	60,09 - 17,92	linear	$0,0194 + 4,617 \cdot 10^{-5} x$	0,9989	< 0,05
155	<i>mio</i> -Inositol	sim	INT	13,29-37,42	cúbico	$-2,89 + 0,158 x - 3,007 \cdot 10^{-4} x^2 + 1,558 \cdot 10^{-7} x^3$	0,9993	< 0,05
166	Rafinose	sim	INT		ns			

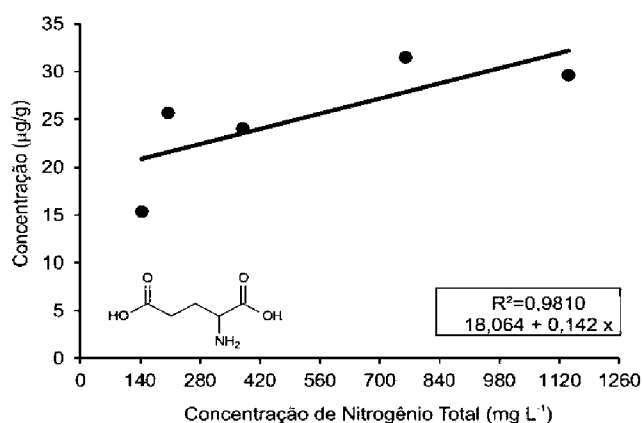
NOTA: NT- variável com diferença estatística para dosagem de nitrogênio; INT- variável com interação, diferença estatísticas entre clone e dosagem de nitrogênio; ns-variável com regressão não significativa. Os metabólitos com diferença apenas genotípica e com distribuição não paramétrica, não foram abrangidos pela análise de regressão, por não ser possível a confecção de curvas que expliquem esse tipo de variável.

Em tecido vegetal foliar, foram encontrados menores quantidades de ácido cítrico (7) em comparação com tecido radicular (Tabelas 17 e 18, $p < 0,05$), já que este metabólito é consumido para produção de diversos outros compostos na via do ácido cítrico para manutenção do metabolismo celular basal na planta (e.g. crescimento via fotossíntese) e, também, para assimilação de nitrogênio através do consumo de 2-oxoglutamato (2-oxo-ácido glutárico (9)), para posterior formação de glutamato e glutamina (SECHLEY; YAMAYA; OAKS, 1992). A semelhança estatística do 2-oxoglutarato ($p > 0,05$) entre os clones e sua diferença entre as doses

de N (NT $p < 0,05$, Tabela 19) no tecido foliar é inerente a sua importância na à fixação de nitrogênio. Entretanto, a sua distribuição ao longo das doses de N não encaixou nos modelos testados (i.e. linear, quadrático ou cúbico).

O transporte de N na planta envolve compostos específicos e geralmente distintos nas diferentes espécies e, os principais produtos envolvidos com a sua assimilação são glutamina (26) e ácido glutâmico (25), os quais são preferivelmente transportados das raízes às folhas via xilema (PALLARDY, 2008). Entre esses, o ácido glutâmico aumenta linearmente, independente do clone, com a com a dose de nitrogênio (NT $p < 0,05$, Tabela 19, Figura 47), indicando uma resposta positiva da planta na assimilação do nitrogênio adicional fornecido.

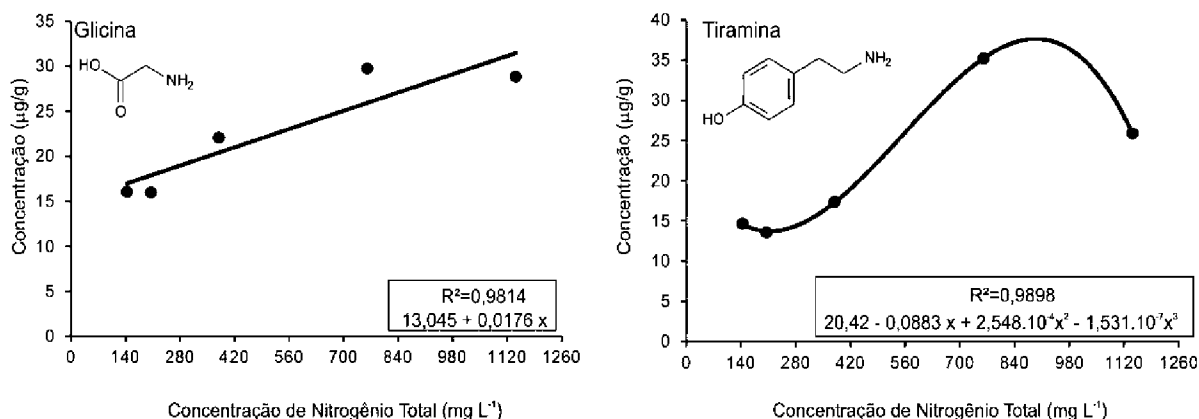
FIGURA 47: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO GLUTÂMICO ($P < 0,01$) EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34



FONTE: O autor (2018).

Interessante mencionar que grande parte dos aminoácidos foram encontrados em tecido foliar (Tabela 18), inclusive glicina (27) e o metabólito tiramina (32) (derivado do aminoácido tirosina), os quais, tiveram sua distribuição modeladas pela a análise de regressão (Tabela 19), e se apresentam matematicamente próximas no mapa de calor (Figura 45). Com aumento da concentração de N total na fertilização dos clones ocorre aumento de glicina de forma linear, enquanto que para tiramina esse aumento ocorre até uma possível saturação do sistema (modelo cúbico), assim, altas dosagens de N implicam em um decréscimo na concentração de tiramina (Figura 48). Como não existe diferença entre os clones, o genótipo foi fator menos importante para esses aminoácidos (HENDRY; STOBART, 1977).

FIGURA 48: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DA GLICINA E TIRAMINA EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34



FONTE: O autor (2018).

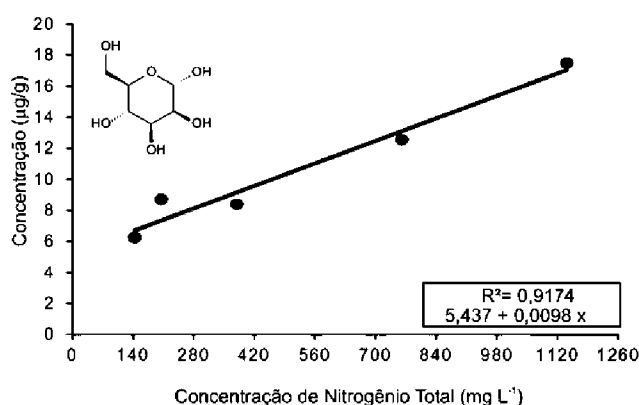
A glicina é importante aminoácido conduzido pelo xilema às folhas e, utilizada como fonte de nitrogênio *in situ* nas últimas, podendo ser usada na síntese de compostos em resposta a assimilação de N e ao estresse salino (CARDI *et al.*, 2015). A assimilação de nitrogênio está, também, diretamente ligada com a síntese da molécula de clorofila (porfirina) nos cloroplastos (RAIJ, 1991; TISDALE *et al.*, 1993).

Com maior concentração de N total no sistema de fertirrigação, menor a regulação osmótica e, maior a concentração de sais no sistema, já que a disponibilidade de água no solo diminui. Um dos mecanismos usados como resposta ao estresse salino é a síntese de solutos compatíveis – conhecidos como osmólitos, que contribuem, entre outras funções, para estabilizar estruturas proteicas (*e.g.* enzimas) (ASHRAF; HARRIS, 2004). Dessa forma a glicina pode estar sendo requerida/produzida em altas concentrações de N para a produção de osmólitos, além da fixação de N na planta e, também, para assimilação de carbono (via produção de clorofila), podendo, então, o seu aumento ser uma resposta as diferentes exigências dessas rotas biossintéticas (Figura 48).

Quanto maior a concentração de clorofila mais eficiente é o processo de fotossíntese e, conseqüentemente maior a produção de carboidratos. O acúmulo de carboidratos facilmente utilizáveis (*e.g.* glicose, frutose, sacarose) (Tabelas 17,18 e 19) não foi observado nos tecidos dos clones estudados. Esse resultado pode estar relacionado à atividade fotossintética, coleta diurna com alta radiação solar (11 h da manhã, novembro) (ESPINOZA *et al.*, 2010; MAGEL; EINIG; HAMPP, 2000). Assim, esses carboidratos eram produzidos e utilizados e, sua economia não era

necessária. No entanto, a produção de açúcares de reservas como a manose (165) e maltose (164) apresentaram distribuições significativas, sendo que a última é fonte secundária de reserva de amido (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004), e importante na distinção entre clones (IVA34 > IVA10, Tabela 17). Já a manose é influenciada somente pela dose de N total, com uma relação linear positiva (Figura 49). Ressaltando que o clone IVA34 apresentou uma maior quantidade desses carboidratos em tecido foliar ($p < 0,05$) e, que maltose foi detectada somente em raízes deste clone (Tabelas 17 e 18). Assim como a maltose, os aminoácidos serina (31), alanina (22) e glutamina (26) apresentaram maior concentração também, para o clone IVA34, sendo alanina e glutamina detectadas exclusivamente em tecido radicular e foliar deste clone, respectivamente. Indicando que os mecanismos de assimilação de nitrogênio são mais eficientes em IVA 34.

FIGURA 49: ANÁLISE DE REGRESSÃO DA MANOSE ($P < 0,01$) EM FOLHAS DOS CLONES IVA 10 E IVA 34



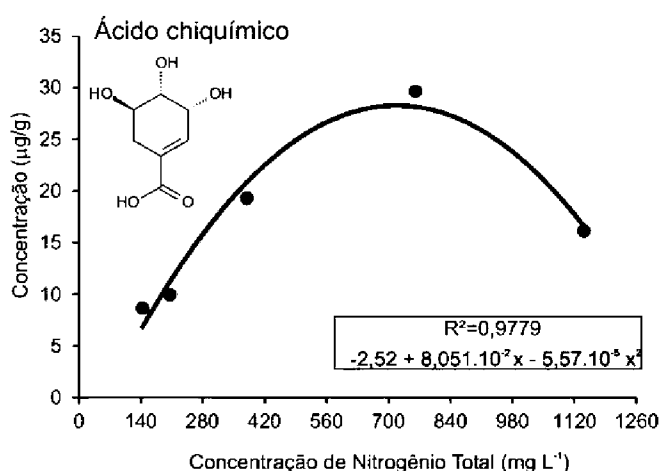
FONTE: O autor (2018).

A tiramina (125) é um composto relacionado ao estresse salino (AZIZ; MARTIN-TANGUY; LARHER, 1999) e produzida via oxidação da tirosina – aminoácido relacionado com a síntese de alcaloides usados na proteção de tecidos e, sua produção é regulada pela rota do chiquimato, diretamente relacionado com o metabolismo do carbono (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, a saturação na produção/decréscimo de tiramina em altas doses de N (Figura 48), pode ser um reflexo de um déficit na assimilação e transporte de nitrogênio, os quais são coordenados pela disponibilidade de produtos da fixação de carbono (e.g. ácido chiquímico). Esses produtos da fixação de carbono são requisitados para diversas

funções, porém, quando a razão C/N é baixa, a assimilação de nitrogênio orgânico diminui devido a menor disponibilidade de carbono.

Em tecido foliar os resultados evidenciam que a concentração dos ácidos (12), quínico (15), succínico (18) e chiquímico (17) foi influenciada somente pela variação de N total (relação NT, Tabela 17. Já em raízes as concentrações dos ácidos quínico e succínico são influenciadas tanto pelas concentrações de nitrogênio quanto pelo genótipo (Tabela 18). A presença do ácido chiquímico (17), exclusivamente em tecido foliar (Tabela 17), é justificada pelo fato deste composto ser um dos produtos chave para formação dos aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano (33) e fenilalanina (29) – sendo que os dois últimos estão presentes unicamente em tecido foliar, e são precursores de compostos de proteção, como alcaloides, compostos fenólicos (e.g. ácidos clorogênicos) e lignina. Uma vez que as partes áreas dos vegetais são mais susceptíveis a fatores nocivos causados por fontes bióticas (e.g. herbívoros) e abióticos (e.g. temperatura, luz solar), logo, é natural que a produção desses compostos sejam conduzidas para a proteção destes tecidos (ALVEZ *et al.*, 1999). A produção de ácido chiquímico (17), nos clones de erva-mate foi influenciada pelo acréscimo das dosagens de N total (Tabela 19), em que o modelo da curva quadrática indica maior produção do composto com o aumento da concentração de N total, até sua saturação e posterior decaimento (Figura 50).

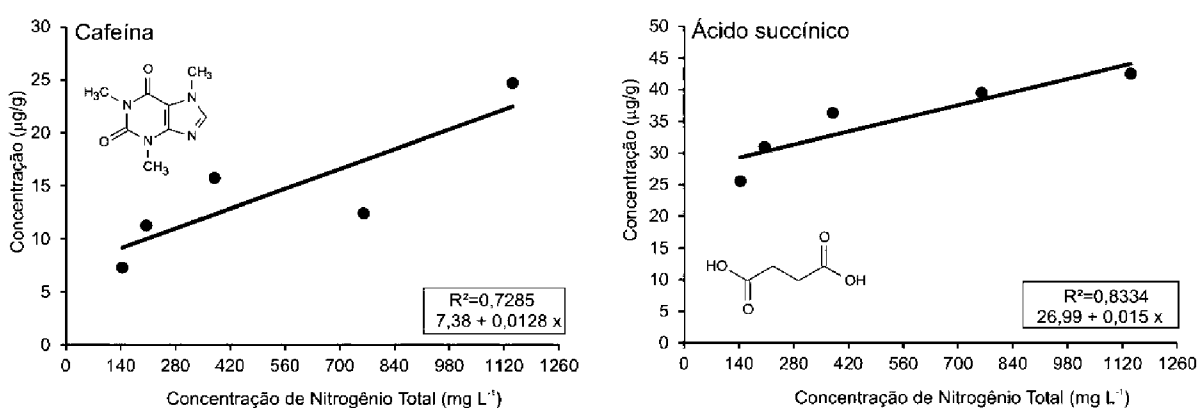
FIGURA 50: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO ($P < 0,001$) EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34



FONTE: O autor (2018).

A cafeína (121) apresentou diferenças em relação às doses de nitrogênio avaliadas ($p < 0,05$), em que ocorre elevação na concentração deste metabólito com o incremento da quantidade de N total (Tabela 19), e sua detecção ocorreu exclusivamente em tecido foliar (Tabelas 17 e 18), fato corroborado com o preconizado na literatura (ZHENG; ASHIHARA, 2004), pois, a biossíntese de metilxantinas ocorre exclusivamente nos tecidos vegetais que contém clorofila (e.g. folhas, brotos, sementes). Nos tecidos foliares dos clones IVA 10 e IVA 34, é verificado (Tabela 19) que o genótipo é fator menos importante para a concentração de cafeína que alterações na fertilização por N, embora o mapa de calor (Figura 45) aponte os Z-scores maiores de cafeína (vermelho) para o clone IVA 34. A análise de regressão (Tabela 19, Figura 51) mostra que a concentração de cafeína (121) aumenta com o acréscimo da concentração das doses de nitrogênio, mesmo padrão visualizado para o ácido succínico (Figura 51). Cardozo e colaboradores (2010) demonstraram pela máxima verossimilhança que os teores de cafeína são significativamente diferentes ($p < 0,05$), dependendo da região de origem, com alta herdabilidade individual. Entretanto, a adubação nitrogenada tem uma forte relação com a concentração de nitrogênio, sugerindo cautela nessa afirmação dependendo do manejo na adubação.

FIGURA 51: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DA CAFEÍNA E ÁCIDO SUCCÍNICO EM TECIDO FOLIAR DOS CLONES IVA 10 E IVA 34

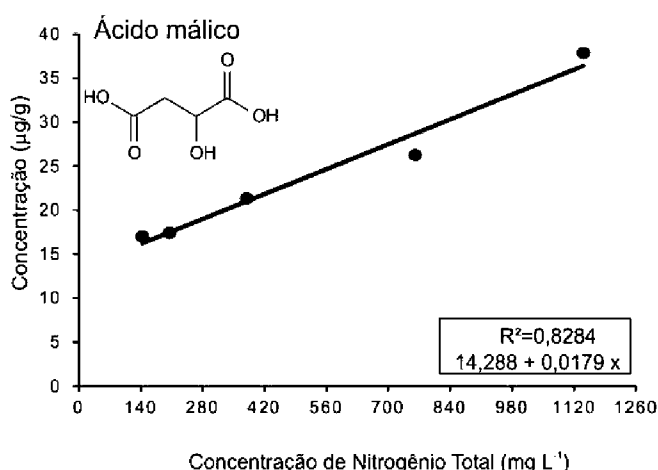


FONTE: O autor (2018).

O ácido succínico é necessário para produção de homocisteína, aminoácido intermediário na formação da SAM (S-Adenosil-Metionina) (Figura 52, KOSHIISHI et

O ácido succínico não regula apenas as reações para formação da SAM, mas também a formação do malato (ácido málico (12)) na via do ácido cítrico (Figura 52), para produção de 2-oxoglutarato. O ácido málico foi influenciado pelo genótipo e pelo fenótipo (doses de nitrogênio x clones), em que, para o clone IVA 34 com o aumento da concentração das doses de nitrogênio ocorre aumento linear da concentração de ácido málico (Figura 53). Também, é possível observar na análise da Tabela 18, que o acúmulo de ácido málico (12), em raiz, aumenta de acordo com a elevação da concentração de nitrogênio, sendo que esse efeito é mais evidente para o clone IVA 34. O mesmo efeito pode ser observado para o ácido succínico (Tabela 18, Figura 51). O malato, após produzido, será, posteriormente, usado na assimilação de nitrogênio para formação de glutamato e glutamina (SECHLEY; YAMAYA; OAKS, 1992).

FIGURA 53: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO ÁCIDO MÁLICO ($P < 0,001$) EM RAÍZES DO CLONE IVA 34



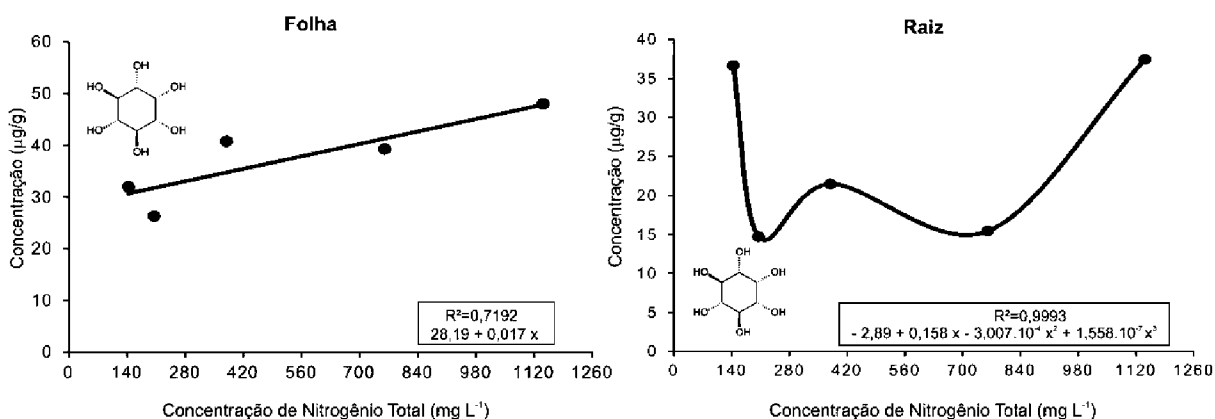
FONTE: O autor (2018).

Além disso, o malato é um importante contra ânion da assimilação de nitrato, e um metabólito de resposta frente a estresse salino (GIBON *et al.*, 2006; PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Como supramencionado, quanto maior a concentração de nitrogênio em sistema de irrigação, maiores recursos de balanceamento osmóticos serão necessários para regular o metabolismo da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013) e maiores serão as concentrações de metabólitos de resposta a esse estresse.

Como a assimilação de nitrogênio ocorre preferencialmente em períodos de escuro, e o material vegetal para as análises de perfil metabólico foram coletados em período fotossintético, era aguardado que as alterações de ácido málico fossem significativas em raízes já que estão diretamente em contato com a solução nutritiva (Tabelas 18 e 19, Figura 53). Assim, pode-se dizer que, maiores concentrações de ácido málico implica em maior produção de 2-oxoglutarato, pois existe maior balanceamento osmótico e, portanto, maior eficiência na fixação de nitrogênio, sendo que este comportamento é mais pronunciado no clone IVA 34 (Figura 53).

Outros osmólitos importantes também foram produzidos em resposta ao incremento de nitrogênio, dois quais se destacam o *mio*-inositol, modelado significativamente apenas para clone IVA 34 (Tabela 19, Figura 54), álcool benzílico (20) e glicerol (152) (Tabela 19). Na Figura 54 pode ser observado o aumento da quantidade de *mio*-inositol com incremento de nutrição por nitrogênio (modelo linear) em tecido foliar do clone IVA 34. Em raízes, o modelo quadrático (Figura 54), sugere que a produção de *mio*-inositol está relacionando tanto com a deficiência de nitrogênio quanto com seu acúmulo.

FIGURA 54: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DO MIO-INOSITOL EM FOLHAS E RAÍZES DE CLONE IVA 34



FONTE: O autor (2018).

A via biossintética do *mio*-inositol é fonte de produtos responsáveis pela composição dos fosfolipídios da membrana plasmática, glicoproteínas, enzimas doadoras de metilas, entre outros. Frente à diminuição da disponibilidade de água, ocasionada pelo acúmulo de eletrólitos (e.g. NO_3^- e NH_4^+) e/ou diminuição nutricional, os vegetais tendem a proteger e garantir que os processos básicos

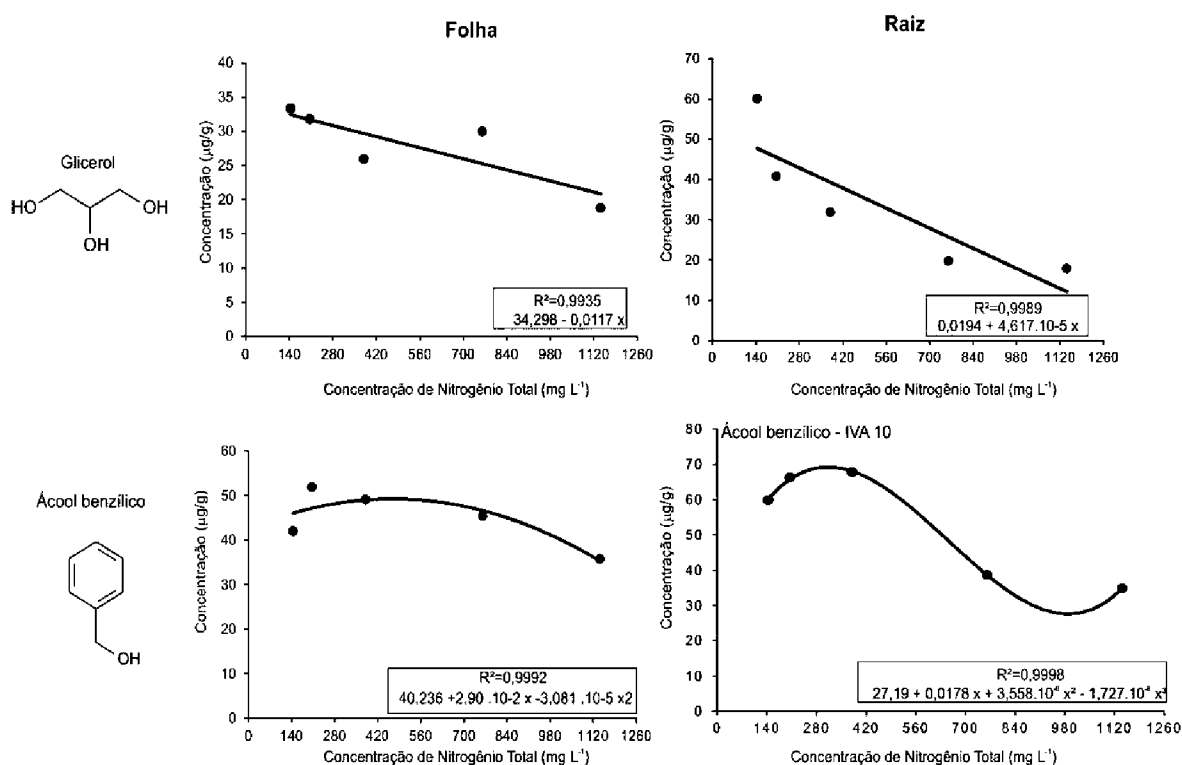
necessários ao funcionamento sejam preferencialmente garantidos como manutenção do transporte de nutrientes e a síntese proteica, sem a qual nem moléculas de ATP poderiam ser formadas e utilizadas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Para que isso ocorra é necessária a presença de enzimas que catalisam reações de metilação, e isto resulta na síntese e acumulação de inositóis metilados. Isto ocorre porque, enzimas responsáveis pela transferência de metilas, tal como a SAM, catalisam a síntese de ácidos nucleicos, formação de amins, aminoácidos, poliamidas, necessários à síntese proteica e, na biossíntese de cisteína, aminoácido importante para assimilação e transporte de enxofre (S) (BOHNERT; JENSEN, 1996). Logo a síntese de myo-inositol além de estar relacionada com eficiência da SAM, o que é amparado pela proximidade deste inositol com ácido succínico, importante para rota dessa enzima (Figura 45, pág.166), é importante fator na regulação da manutenção das taxas de fotossíntese e na distribuição de nutrientes.

Consequentemente, o transporte de compostos nitrogenados (aminoácidos) para a formação de proteínas, diminui com o decréscimo da razão C/N, assim como os processos de transformações bioquímicas enzimáticas dos metabólicos, sendo preferencialmente mantidos os recursos essenciais nas plantas tais como crescimento e manutenção de taxas energéticas (ATP) (PALLARDY, 2008)

Os outros osmólitos de proteção glicerol e álcool benzílico, foram regulados de forma distinta pela adição de nitrogênio. Enquanto o primeiro teve regressão linear negativa (tanto em folhas como em raiz), o segundo foi melhor usado como osmólito em IVA 10 (Figura 55).

O glicerol é utilizado na produção de lipídeos que funcionam como reserva energética, bem como sua catabolização para produção de piruvato, essencial para manutenção dos processos de metabolismo de carbono e na produção de aminoácidos (KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2016). Em situação de estresse osmótico, como já citado, a manutenção das vias do metabolismo básico da planta de produção de açúcar e de energia é preferencialmente produzido, assim, como a molécula de piruvato é base para produção de diversos compostos inclusive nas vias do ácido cítrico (indispensável à produção de aminoácidos), a catabolização de glicerol (Figura 55), para suprimento de piruvato, se torna prioridade em relação a formação de lipídeos.

FIGURA 55: ANÁLISE DE REGRESSÃO DO GLICEROL ($P < 0,05$) EM FOLHAS E RAÍZES DE CLONE IVA 34 E ÁCOOL BENZÍLICO ($P < 0,05$) EM FOLHAS DOS CLONES IVA 10 E IVA 34 E SOMENTE RAIZ DE IVA 10



FONTE: O autor (2018).

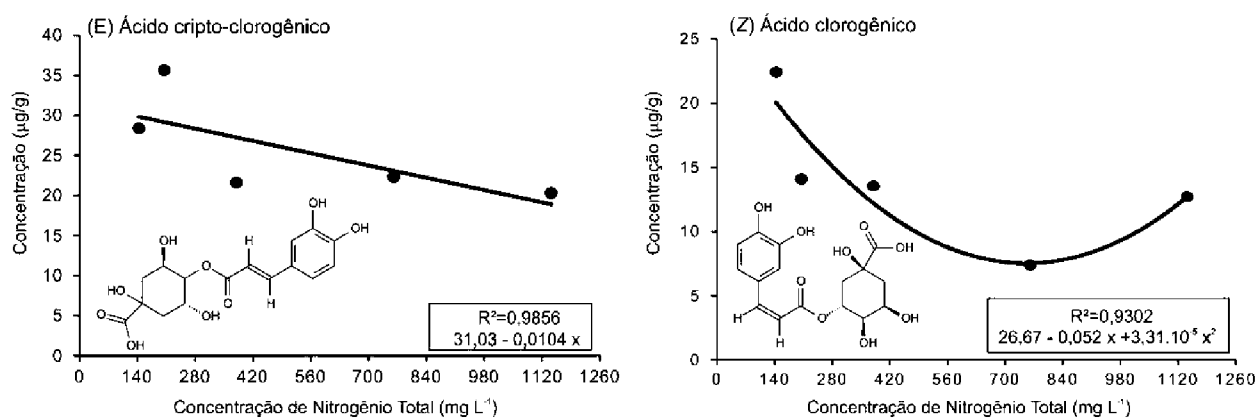
Entre os osmólitos de proteção mencionados o álcool benzílico foi significativo apenas em raiz de IVA 10, que não apresentou diferenças na produção do ácido málico, importante osmólito à assimilação de N (Figura 53). Assim os sistemas de contrabalanceamento em IVA 10 parecem ser menos eficientes que os apresentados pelo clone IVA 34, que além de álcool benzílico (Figura 55) apresentou outros compostos importantes para proteção a estresse salino, inclusive aqueles relacionado a melhor fixação de nitrogênio (e.g. ácido málico) (Figura 53).

Como anteriormente mencionado o ácido chiquímico, juntamente com o ácido quínico, também é precursor dos compostos antioxidantes mais relatados na espécie de *I. paraguariensis*: os ácidos clorogênicos (FILIP *et al.*, 2001). Os ácidos clorogênicos podem aparecer como estereoisômeros *E* e *Z* em que os isômeros *E* são a forma preferencialmente produzida e utilizada pelos vegetais e, a forma *Z*, pode ser decorrente da foto-isomerização produzida como resposta de defesa (SALUM *et al.*, 2015). Tanto em tecido foliar quanto em raiz, os ácidos clorogênicos

(131) (ácido 3-cafeiolquínico) e neo-clorogênico (134) (ácido 5-cafeiolquínico), principalmente ao que se diz respeito aos estereoisômeros *E*, foram significativamente diferentes em relação ao genótipo, não sendo influenciados pelas doses de nitrogênio (Tabela 17 e 18). Muitos compostos produzidos na parte superior dos tecidos são transportados via floema para o restante da planta, inclusive os ácidos fenólicos às raízes. Portanto, esperava-se que o consumo desses isômeros fosse maior em folhas e, que os mesmos não exibissem alterações nesse tecido, já que a foto-isomerização está relacionada com a intensidade luminosa do dia, e o tecido foliar foi coletado no mesmo período fotossintético, impedindo que as variações de produção e consumo desses metabólitos fossem detectadas nos clones IVA 10 e IVA 34.

Entre os ácidos antioxidantes o ácido clorogênico (131) é o mais abundantemente na composição da erva-mate (HECK; MEIJA, 2007) e, em raiz, apresentou comportamento quadrático, sem influência do genótipo (Tabela 19, Figura 56). O fato da produção dos estereoisômeros *E* dos ácidos clorogênicos não serem influenciáveis pela nutrição (doses de NT), mas sim pelo genótipo (diferente entre os clones), pode indicar uma possível hereditariedade destes compostos (Tabelas 17 e 18). A possível sucessão genética destes compostos fenólicos, vai em desconformidade com o descrito na literatura, já que o ácido clorogênico apresentou baixa herdabilidade média em progênies de erva-mate (CARDOZO *et al.*, 2010). Entretanto, como esses ácidos fenólicos são metabólitos secundários que respondem ao meio ambiente (vide capítulo 2), os dados de campo, com diferentes variações climáticas, podem influenciar na resposta de hereditariedade, diferentemente do que acontece em casa de vegetação, onde o ambiente é controlado. Isso aliado com a coleta de tecidos em um único período do dia possibilitou a observação da diferença desses ácidos clorogênicos entre os clones. Em contrapartida, em tecido foliar, o ácido cripto-clorogênico (133) (ácido 4-cafeiolquínico), é um composto que teve sua produção afetada pela nutrição com N (Tabela 19). O modelo linear indicou menor produção do composto com o aumento da concentração de nitrogênio (Figura 56), provavelmente relacionada com a saturação na produção de ácido chiquímico (Tabela 19, Figura 50).

FIGURA 56: ANÁLISE DE REGRESSÃO ($P < 0,05$) DO (E) ÁCIDO CRIPTO-CLOROGÊNICO EM TECIDO FOLIAR E DO ÁCIDO (Z) CLOROGÊNICO EM RAÍZES NOS CLONES IVA 10 E IVA 34



FONTE: O autor (2018).

CONCLUSÃO

O perfil metabólico dos clones de erva-mate estudados demonstrou que a assimilação de nitrogênio está ligada ao ciclo do carbono. Um número maior de compostos foi detectado no tecido foliar.

O consumo de ácido cítrico para manutenção do metabolismo celular basal na planta e, assimilação de nitrogênio através do consumo de 2-oxoglutamato, metabólito base à fixação de N foram observados, sendo o genótipo importante nessa relação (IVA34 melhor que IVA10).

O incremento de nitrogênio no sistema nutricional de irrigação levou ao estresse salino do sistema, e este induziu a produção e consumo de osmólitos que contribuem para estabilizar estruturas proteicas e enzimas (*e.g* SAM).

O clone IVA 34 apresentou melhores mecanismos na assimilação de nitrogênio, pois maiores quantidades de ácido málico, importante contra ânion necessário a fixação desse nutriente, apresentou correlação linear significativa a adição de N total ao sistema.

Com relação aos compostos fenólicos na erva-mate, os isômeros E em tecido foliar, dos ácidos clorogênico e neo-clorogênico, não apresentaram diferenças nas suas concentrações com respeito a nutrição de N total, indicando que as concentrações destes compostos podem ser controladas em sistemas protegidos.

A análise de regressão da cafeína demonstrou que o seu aumento é linear ao acréscimo da concentração nas doses de N total, e este acréscimo foi independente do genótipo.

REFERÊNCIAS

- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008.
- ASHRAF, M. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant science**, v. 166, n. 1, p. 3-16, 2004.
- AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY, J.; LARHER, F. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. **Plant Science**, v. 145, n. 2, p. 83-91, 1999.
- BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.
- BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996.
- CARDI, M.; CASTIGLIA, D.; FERRARA, M.; GUERRIERO, G.; CHIURAZZI, M.; ESPOSITO, S. The effects of salt stress cause a diversion of basal metabolism in barley roots: possible different roles for glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 44-54, 2015.
- CARDOZO JR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.
- DETHLOFF, F. ERBAN, A., ORF, I., ALPERS, J., FEHRLE, I., BEINE-GOLOVCHUK, O., ... & KOPKA, J. Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Plant Cold Acclimation**. Humana Press, New York, NY, p.171-197, 2014.
- ESPINOZA, C.; DEGENKOLBE, T., CALDANA, C., ZUTHER, E., LEISSE, A., WILLMITZER, L., ... & HANNAH, M. A. Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in Arabidopsis. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14101, 2010.
- FERNANDES, J. S. C.; USHIWATA, S.; DE MATTOS DAMINELLI, R.; GABARDO, J.; KOBIYAMA, M.; JUNIOR, A. M.; ... STURION, J. A. I. Estimativas de parâmetros relacionados ao melhoramento genético da erva-mate: possibilidade de seleção precoce. **Scientia Agrária**, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2000.
- GIBON, Y.; USADEL, B.; BLAESING, O. E.; KAMLAGE, B.; HOEHNE, M.; TRETHEWEY, R., & STITT, M. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. **Genome biology**, v. 7, n. 8, R76 p., 2006.

GUTIÉRREZ, R. A.; LEJAY, L. V.; DEAN, A.; CHIAROMONTE, F.; SHASHA, D. E.; CORUZZI, G. M. . Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. **Genome biology**, v. 8, n. 1, R7 p., 2007.

HAIR Jr., J. F. et al. Análise multivariada de dados. São Paulo: Bookman, 2005

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138 – 151, 2007.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B. Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. **Plant Biochem**, v. 12, n.1, p. 275-308, 2005.

HENDRY, George AF; STOBART, Allan K. Glycine metabolism and chlorophyll synthesis in barley leaves. **Phytochemistry**, v. 16, n. 10, p. 1567-1570, 1977.

HUMMEL, J., STREHMEL, N., SELBIG, J., WALTHER, D., KOPKA, J. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. **Metabolomics**, v. 6, n. 2, p. 322-333, 2010.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G. Biosynthesis of pyruvic acid from glucose by *Blastobotrys adenivorans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7689-7697, 2016.

KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKEMEYER, C.; USADEL, B., BERGMÜLLER, E.; ... WILLMITZER, L. GMD@ CSB. DB: the Golm metabolome database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635-1638, 2005.

KOSHIISHI, C.; KATO, A.; YAMA, S.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. **FEBS letters**, v. 499, n. 1-2, p. 50-54, 2001.

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K., MOUNIER, E.; ... ZAZIMALOVA, E. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental cell**, v. 18, n. 6, p. 927-937, 2010.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; REDESTIG, H.; SAITO, K. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1439-1453, 2011.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG, K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24., n.5, p.732-737, 2008.

MAGEL, E.; EINIG, W.; HAMPP, R. Carbohydrates in trees. In: **Developments in crop science**. v. 26, p. 317-336, 2000.

MEYER, R. C.; STEINFATH, M.; LISEC, J.; BECHER, M.; WITUCKA-WALL, H.; TÖRJÉK, O.; ... & ALTMANN, T. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4759-4764, 2007.

MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 111-119, 2007.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular plant**, v. 3, n. 6, p. 973-996, 2010.

PALLARDY, S. G. Nitrogen Metabolism. Chapter 9. **Physiology of Woody Plants** (Third Edition), p. 233-254, 2008.

PARIDA, A. K.; PANDA, A.; RANGANI, J. Metabolomics-Guided Elucidation of Abiotic Stress Tolerance Mechanisms in Plants. In: **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. Chapter 5, p. 89-131, 2018.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: julho de 2018.

RAIJ, B. V. *Fertilidade do solo e adubação*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Editora Agronomica Ceres, São Paulo, Brasil, 343p., 1991.

SCHACHTMAN, D. P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 47-69, 2007.

SCHEIBLE, W.; LAUERER, M.; SCHULZE, E. D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **The Plant Journal**, v. 11, n. 4, p. 671-691, 1997.

SECHLEY, K. A.; YAMAYA, T.; OAKS, A. Compartmentation of Nitrogen Assimilation in Higher Plants¹. **International Review of Cytology**, v. 134, p. 85-163, 1992.

STITT, M.; LUNN, J.; USADEL, B. *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism—more than the icing on the cake. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1067-1091, 2010.

STREHMEL N., HUMMEL J., ERBAN A., STRASSBURG K., KOPKA J. Retention Index Thresholds for Compound Matching in GC-MS Metabolite Profiling. **Journal of Chromatography**. v. 871, p. 182-190, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. 2013.

TSCHOEP, H.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; ARMENGAUD, P.; SZECOWKA, M.; NUNES-NESI, A.; STITT, M. Adjustment of growth and central metabolism to a mild

but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 3, p. 300-318, 2009.

TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D.; HAVLIN, J.L. **Soil fertility and fertilizers**. 5th edition. Macmillan Publishing Co., NY. 634 p., 1993.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Genetics of the Azospirillum-plant root association. **Critical reviews in plant sciences**, v. 14, n. 5, p. 445-466, 1995.

VIDAL, E. A.; GUTIERREZ, R. A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 5, p. 521-529, 2008.

WARNER, R. L.; KLEINHOF, A. Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 245-252, 1992.

WEISE, S.E.; WEBER, A.P.M.; SHARKEY, T. D. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. **Planta**, v. 218, n. 3, p. 474-482, 2004.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicépas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico. **Embrapa Florestas. Circular técnica**, 2008.

WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. **Análise de regressão: como entender o relacionamento entre as variáveis de um processo**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, v.7, 311 p., 1996.

ZHENG, X.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 807-813, 2004.

PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos correlacionando fenótipos e perfil de metabólitos ainda são escassos, principalmente que se refere a plantas de ecossistemas florestais. Nos próximos estudos é importante correlacionar as condições de casa de vegetação e campo, buscando padrões e diferenças nos perfis dos compostos analisados, com o intuito de validar o experimento em sistemas controlados. Além disso, a análise de metabólitos primários pode ser correlacionada com as demais “ômicas”.

Assim sugere-se como temas a serem abordados:

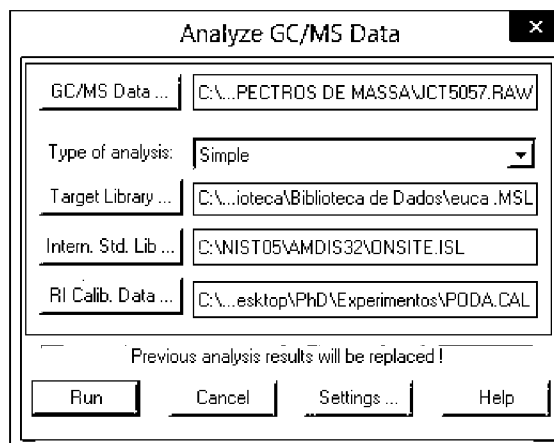
- Obtenção de metaboloma bem como proteoma na identificação de enzimas ativas (e.g. SAM) na síntese de compostos alvos;
- Estudos relacionando perfil metabólico de *Ilex paraguariensis* e parâmetros físico-químicos da produção de massa foliar, para maior entendimento dos processos envolvidos na produção de biomassa da espécie;
- Identificar biomarcadores na seleção de mudas juvenis com auto rendimento de massa foliar, aliado a qualidade composicional de compostos de interesse comercial (e.g. cafeína, ácidos clorogênicos, flavonoides);
- Comparação entre metabólitos e proteínas enzimaticamente ativas com a identificação de genes e assim aprimorar técnicas de melhoramento genético.

APÊNDICE A – CRIAÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE COMPOSTOS ALVOS

Biblioteca de calibração:

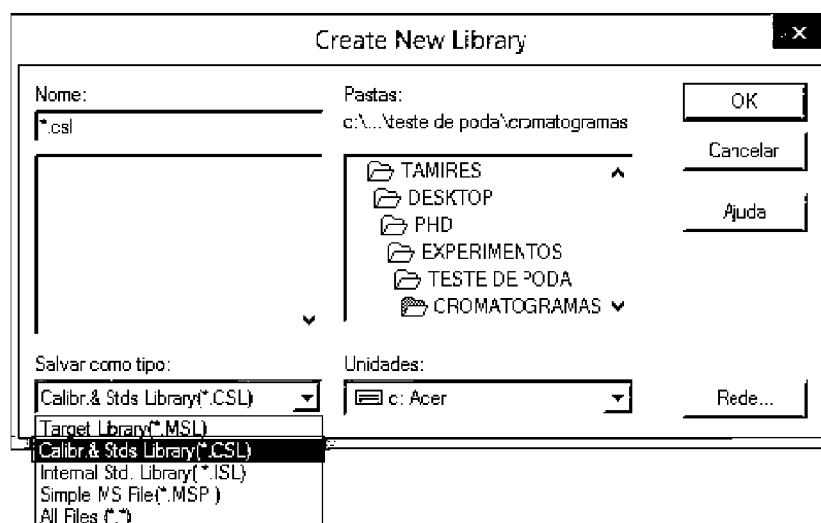
- 1) Abrir o cromatograma do padrão de hidrocarbonetos no AMDIS, e analisar no modo 'Simple' (Figura A).

FIGURA A: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA ESCOLHA DO TIPO DE ANÁLISE DE UM CROMATOGRAMA NO MODO SIMPLE



- 2) Criar uma nova biblioteca na extensão *.CSL (Figura B).

FIGURA B: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA ESCOLHA DE TIPO DE BIBLIOTECA. NO DETALHE A SELEÇÃO DE BIBLIOTECA DE CALIBRAÇÃO *.CSL.



- 3) Salvar com nome apropriado.
- 4) Inserir os hidrocarbonetos individualmente na biblioteca com o IR convencional (e.g. undecano – IR = 1100 e triacontano – IR = 3000) (Figura C).

Obs: Clicar no componente “▼”, ir em ‘Library’, ‘Build Library’ (com a biblioteca *.CSL já nomeada), ‘Add’ o componente referente ao hidrocarboneto. Em ‘Edit’, o alcano é nomeado, e seu IR correspondente adicionado (Figura D).

FIGURA C: CROMATOGRAMA GERADO PELO PROGRAMA AMDIS APÓS INSERÇÃO DOS HIDROCRABONETOS NA CRIAÇÃO DE BIBLIOTECA *.CSL.

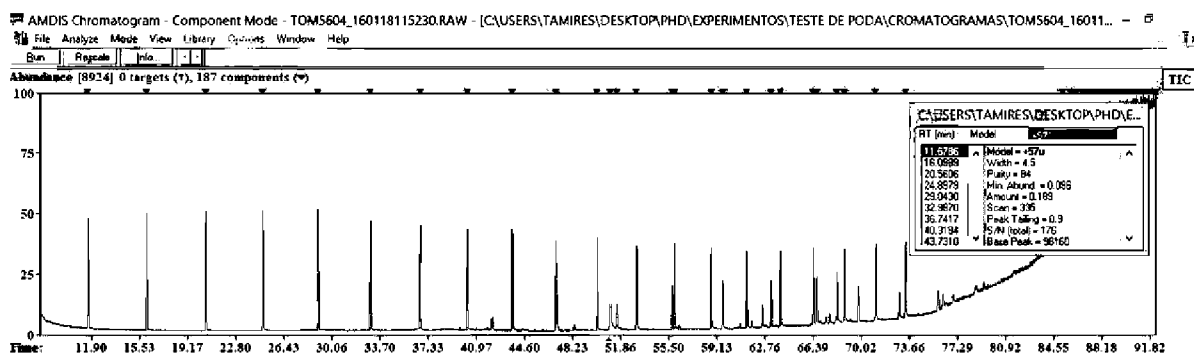
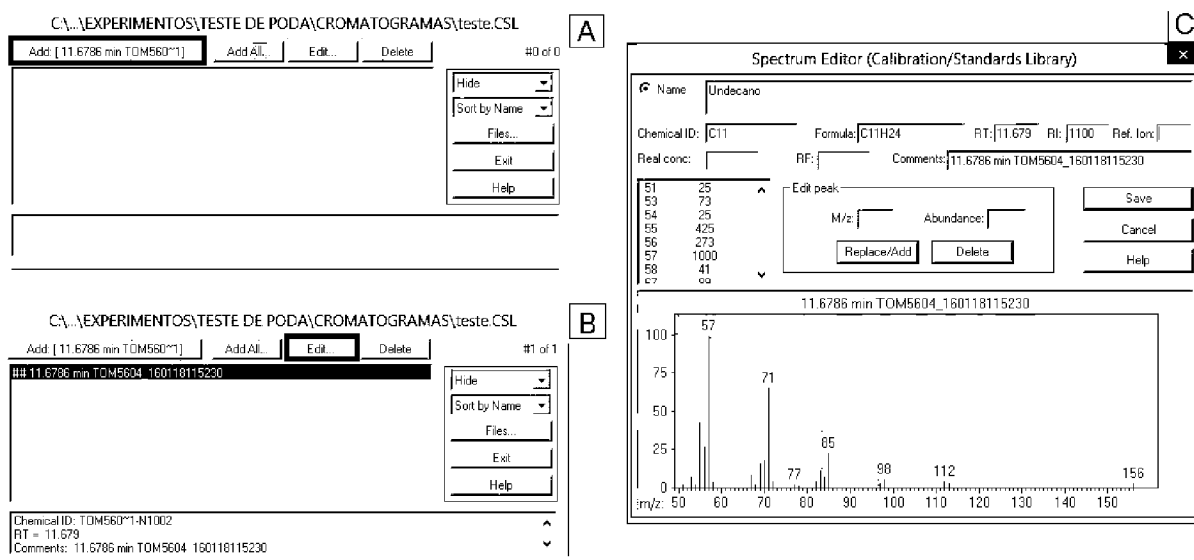
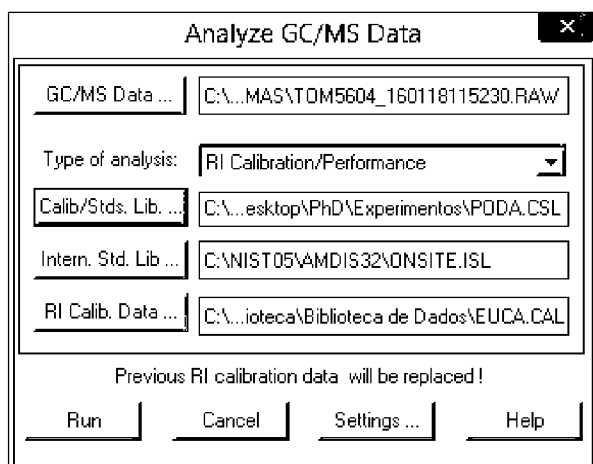


FIGURA D: JANELAS CRIADAS NO PROGRAMA AMDIS PARA INSERÇÃO DOS IR DOS HIDROCARBONETOS, APÓS SELEÇÃO DO COMPONENTE O COMPOSTO É ADICIONADO (A) NA BIBLIOTECA *.CSL CRIADA, E EDITADO (B) ONDE AS INFORMAÇÕES REFERENTES AO COMPOSTOS SÃO ADICIONADAS (C).



- 5) Realizar a calibração através do ícone 'RI Calibration/ Performace', afim de criar a biblioteca de extensão *.CAL, a qual contém seus respectivos IR (Figura E), para isso na aba "Calib/Std. Lib" adiciona-se a biblioteca *.CSL e na aba 'RI caib. Data' adiciona-se um arquivo de extensão *.CAL (a ser criado na pasta de destino desejada) a qual é usado para calcular o IR dos cromatogramas a ser analisado (Figura F).

FIGURA F: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA REALIZAÇÃO DO 'Ri Calibration/Performance', DENTRO DO ÍCONE 'Analyse GC/MS Data', NO MENU INICIAL DO PROGRAMA.



- 6) Certificar a calibração do IR através do ícone "Performace Check for RI" (Figura F) o que gera um resultado no qual pode-se verificar se os hidrocarbonetos possuem o IR correto, no exemplo o IR do undecano fornecido o valor de RI – RI_(lib) igual a zero (Figura G).

FIGURA F: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA REALIZAÇÃO DO 'Performance Check for RI', DENTRO DO ÍCONE 'Analyse GC/MS Data', NO MENU INICIAL DO PROGRAMA.

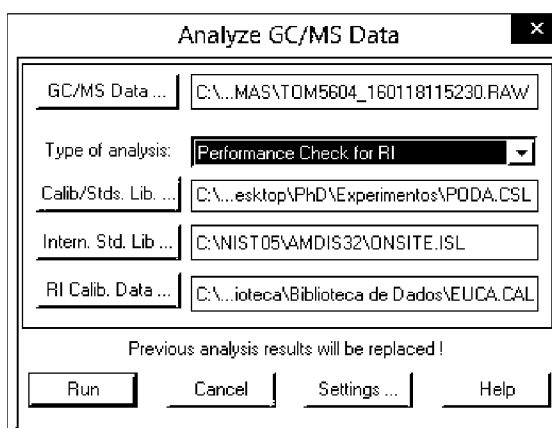
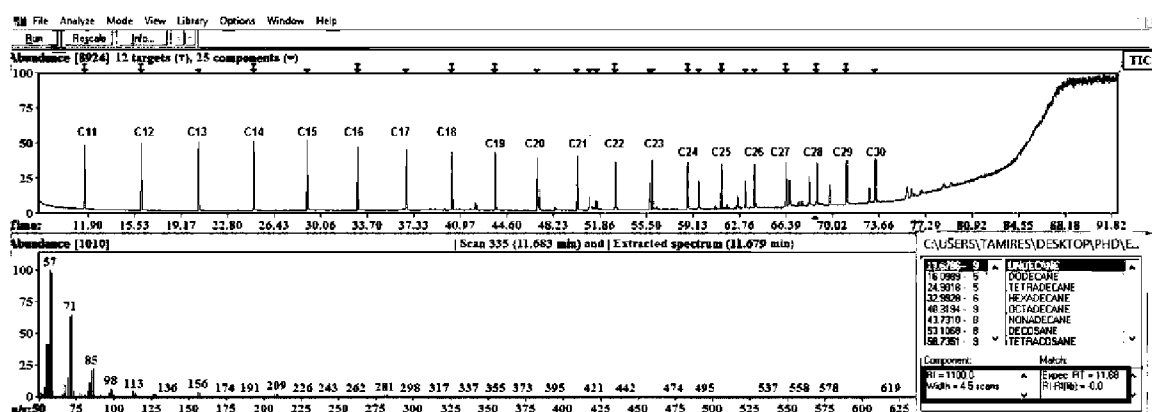


FIGURA G: CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS DO PADRÃO DE ALCANOS GERADA NO PROGRAMA AMDIS, APÓS CRIAÇÃO E CALIBRAÇÃO DA BIBLIOTECA DE IR.

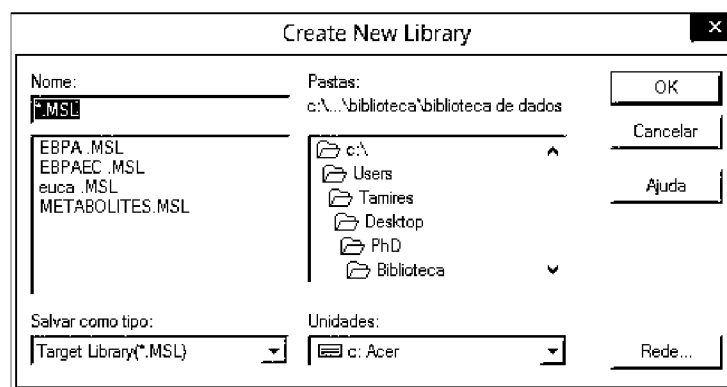


Biblioteca de compostos alvos:

A inserção dos dados de espectros de massas para novos compostos é feita a partir da criação de uma biblioteca dentro do AMDIS na extensão *.MSL, na qual informações como classe química do composto, IR, TR, íon característico podem ser atribuídos ao componente identificado.

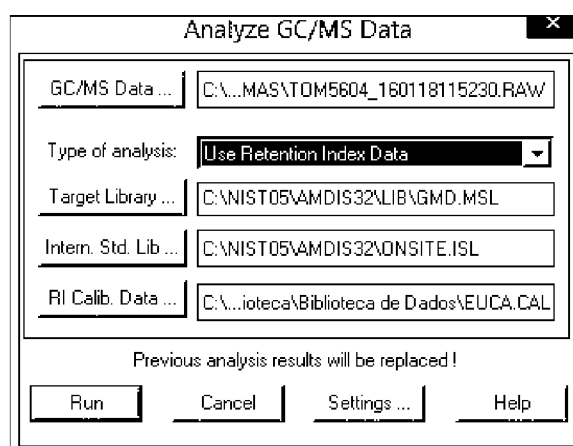
- 1) Abrir o cromatograma a ser analisado.
- 2) Criar uma nova biblioteca na extensão *.MSL (nenhum composto inserido) (Figura H).

FIGURA H: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA ESCOLHA DE TIPO DE BIBLIOTECA. NO DETALHE A SELEÇÃO DE BIBLIOTECA DE PARA INSERÇÃO DE COMPOSTOS ALVO *.MSL.



- 3) Salvar com nome apropriado.
- 4) Analisar o cromatograma em '*Use Retention Index Data*', sendo que na aba '*Target library*' adiciona-se a biblioteca *.MSL e na aba '*RI Calibration. Data*' adiciona-se o arquivo de *.CAL gerado na calibração do IR (Figura I).

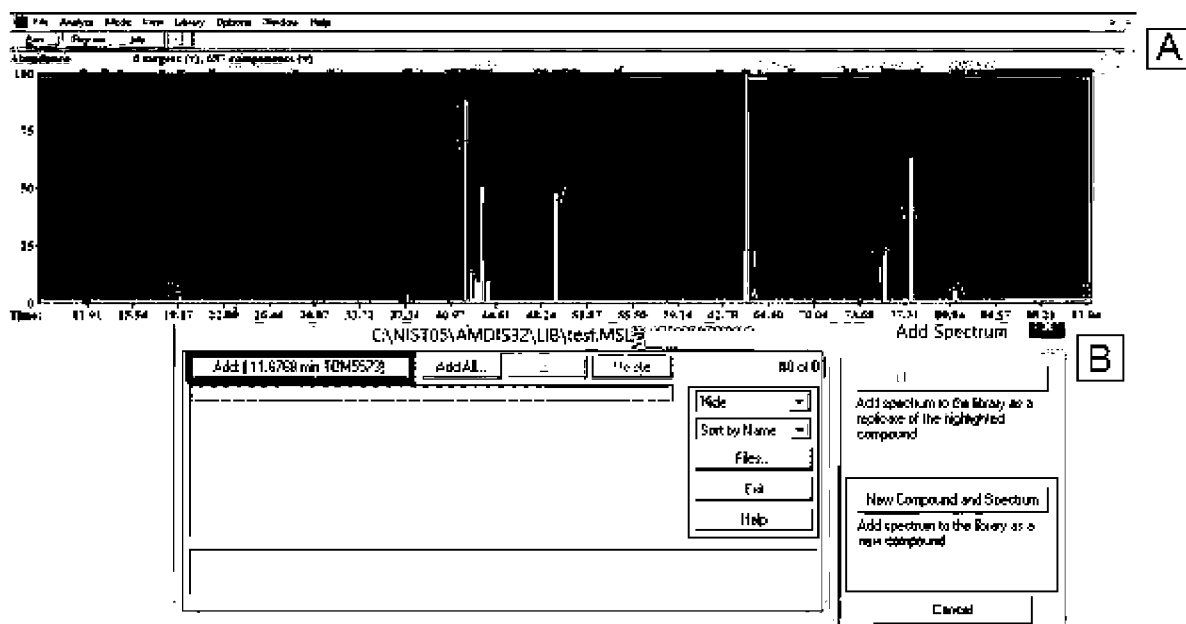
FIGURA 18: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS PARA REALIZAÇÃO DO '*Use Retention Index Data*', DENTRO DO ÍCONE '*Analyse Gc/Ms Data*', NO MENU INICIAL DO PROGRAMA.



- 5) Verificar todos os componentes "▼"apresentados, e inserir na biblioteca (Figura J).

Obs: Os compostos devem ser inseridos um a um, sugere-se verificar se esse apresenta pureza superior á 70%, indicando que o pico em questão não apresenta outros compostos e se possui espectro de massas adequado ao esperado.

FIGURA J: COMPONENTES PRESENTES EM UM (A) CROMATOGRAMA DA CORRENTE TOTAL DE ÍONS DE UM CROMATOGRAMA DE INTERESSE GERADA NO PROGRAMA AMDIS E, (B) JANELAS GERADAS PARA REALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DE UM COMPOSTO NOVO NA BIBLIOTECA *.MSL CRIADA, NO ÍCONE 'Library', NO MENU INICIAL DO PROGRAMA.



- 6) Após os componentes inseridos, as informações desses podem ser atualizadas clicando em cima do composto inserido na biblioteca e após em "Edit" e então em "Compound" (Figura K).

FIGURA K: JANELA GERADA PELO PROGRAMA AMDIS EDIÇÃO DE UM COMPOSTO ADICIONADO NA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ALVO *.MSL

Figure K is a 'Compound Information Editor' dialog box. It contains the following fields and values:

- Chemical ID: EBPA_000000055
- Chemical class: sugar
- Retention: 1875
- Ref. conc:
- Resp. factor:
- Formula:
- Ref. Ion: 217
- Window: 15
- Time (RT): 57.030
- Notes:
- Names and synonyms: Fructose, D (Z) 1MEQX 5TMS

Buttons at the bottom: Save, Cancel, Help.

APÊNDICE B – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE DE CICLO DIURNO/ NOTURNO DOS CLONES AC1 E BC1

(continua)

Concentração (µg/g)																		
□ AC1 ■ BC1																		
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h	
							média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)
19	A124002-101	1221,72	A124002 ^{INT}	117	103	130	46,65 ^a	19,16	107,16 ^{b,c}	25,55	57,97 ^a	46,57	26,76 ^a	23,69	70,89 ^b	29,52	31,31 ^a	4,15
							92,57 ^b	44,91	125,69 ^{b,c}	38,95	163,95 ^c	43,62	70,97 ^b	36,25	80,68 ^b	56,44	70,70 ^b	45,54
20	A140003-101	1370,74	A140003 ^{NS}	143	233	306	14,61	89,05	57,99	123,88	63,40	144,74	24,21	73,27	84,00	67,33	4,25 ^b	2,49
							5,71	22,01	46,71	190,77	10,65	47,33	11,07	32,86	3,97	36,56	7,89	44,85
21	A141003-101	1388,91	A141003 ^{INT}	131	192	102	ND ^a		121,86 ^b	27,33	ND ^a		ND ^a		143,99 ^b	27,59	ND ^a	
							ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a			
22	A142003-101	1401,04	A142003 ^{INT}	129	234	144	11,00 ^a	33,15	ND ^b		7,38 ^a		ND ^b		24,59 ^a	129,39	ND ^b	
							ND ^b		ND ^b		ND ^b		ND ^b		ND ^b			
26	A145016-101	1454,42	A145016 ^{INT}	104	144	162	46,75 ^a	25,85	86,72 ^a	29,28	69,42 ^a	32,87	61,46 ^a	21,37	8,42 ^b	34,65	64,80 ^a	34,36
							87,82 ^a	54,85	77,51 ^a	28,05	91,91 ^a	35,71	140,16 ^c	28,97	57,23 ^a	26,99	90,13 ^a	44,73
27	A147011-101	1464,11	A147011 ^{INT}	103	173	262	28,72 ^{a,b}	3,81	75,17	19,89	67,55	44,32	56,59	26,79	66,65	47,58	54,42	39,94
							82,81 ^a	55,70	76,43	33,91	77,65	37,76	113,44 ^b	26,54	41,89	53,69	63,78	42,78
28	A155003-101	1541,53	A155003 ^{INT}	263	278	264	69,15 ^{a,b}	17,93	85,87 ^{a,b}	16,44	118,69 ^b	20,97	57,55 ^a	21,23	53,93 ^a	22,89	52,79 ^a	12,55
							179,36 ^c	41,16	111,24 ^b	11,69	92,54 ^b	12,91	123,28 ^{b,c}	13,46	86,28 ^{b,c}	59,27	59,96 ^a	14,40
30	A176001-101	1742,97	A176001 ^{INT}	117	102	130	28,23 ^a	28,21	64,91 ^a	33,56	48,15 ^a	23,63	56,37 ^a	45,94	ND ^b		37,38 ^a	39,63
							ND ^b		54,64 ^a	48,64	ND ^b		161,84 ^c	37,41	32,18 ^a	20,64	ND ^b	
31	A165004-101	1638,32	A165004 ^{INT}	97	231	246	ND ^a		110,81 ^b	29,19	ND ^a		93,98 ^b	31,29	11,84 ^c	38,72	18,54 ^c	41,60
							106,51 ^b	43,66	ND ^a		ND ^a		ND ^a		111,60 ^b	63,51	ND ^a	
32	A167004-101	1658,70	A167004 ^{INT}	155	102	171	ND ^a		228,87 ^b	35,23	ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a	
							ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a	
34	A171003-101	1692,47	A171003 ^{INT}	275	156	128	98,24 ^a	30,01	190,85 ^b	42,50	ND ^c		ND ^c		ND ^c		ND ^c	
							ND ^c		149,30 ^{a,b}	52,20	ND ^c		ND ^c		ND ^c		ND ^c	
35	A172005-101	1702,68	A172005 ^{INT}	173	156	90	67,88 ^a	40,96	264,89 ^b	60,75	175,08 ^b	51,95	52,32 ^a	56,83	48,68 ^a	4,33	7,90 ^c	71,36
							83,92 ^a	39,62	161,11 ^{a,b}	57,93	113,48 ^{a,b}	78,74	151,72 ^{a,b}	41,59	19,77 ^c	26,75	ND ^d	
36	A174001-101	1732,08	A174001 ^{INT}	205	217	189	37,43 ^a	17,15	77,86 ^b	16,01	80,39 ^{b,c}	31,15	64,88 ^b	4,95	51,75 ^{a,b}	31,80	46,72 ^a	13,66
							60,86 ^b	22,75	77,73 ^b	10,74	86,66 ^{b,c}	27,84	114,73 ^c	30,65	41,39 ^{a,b}	43,87	56,32 ^{a,b}	13,52
37	A174005-101	1723,17	A174005 ^{INT}	117	392	276	ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a	
							ND ^a		95,42 ^b	49,28	ND ^a		ND ^a		ND ^a		ND ^a	

(continua)

Concentração (µg/g)																		
□ AC1 ■ BC1																		
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h	
							média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)
38	A175008-101	1740,69	A175008 ^{INT}	392	198	276	66,02 ^a 83,00 ^a	29,57 38,80	67,67 ^a 118,02 ^{a,c}	25,24 45,74	ND ^b 94,06 ^{a,c}	33,15	88,48 ^a 138,78 ^c	31,12 22,53	46,26 ^a 57,65 ^a	38,95 28,50	45,93 ^a ND ^b	42,55
42	A182009-101	1806,00	A182009 ^{NS}	231	293	294	48,75 67,08	23,03 39,21	77,70 92,55	20,39 38,51	63,40 86,69	27,09 38,02	46,98 147,89	41,80 42,33	41,75 32,48	28,43 28,41	46,31 46,12	33,30 33,91
46	A197001-101	1963,74	A197001 ^{NS}	169	105	82	14,35 26,70	12,32 66,10	27,98 19,01	23,72 53,22	66,67 27,42	57,89 36,50	23,95 43,11	71,89 88,03	48,38 27,60	67,29 42,49	34,20 28,68	45,52 24,82
47	A197007-101	1962,09	A197007 ^{INT}	394	307	277	67,29 ^a ND ^c	18,60	90,87 ^a ND ^c	27,85	98,23 ^a ND ^c	43,44	78,27 ^a ND ^c	35,72	58,98 ^a 37,25 ^{a,b}	34,30	8,82 ^b ND ^c	38,44
48	A199003-101	1980,30	A199003 ^{INT}	129	143	157	54,89 ^a 114,46 ^{b,c}	24,18 32,21	96,20 ^b 136,62 ^{b,c}	27,59 21,45	101,48 ^b 103,25 ^b	45,28 17,47	78,59 ^{a,b} 154,20 ^c	35,27 32,06	86,69 ^{a,b} 92,19 ^b	4,96 49,69	61,44 ^{a,b} ND ^d	53,93
49	A202004-101	2010,27	A202004 ^{INT}	191	305	318	ND ^a 115,20 ^b		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a 112,06 ^b		ND ^a ND ^a	
51	A211001-101	2098,30	A211001 ^{INT}	217	205	173	45,05 ^a 83,41 ^b	22,31 29,34	102,23 ^{b,c} 89,19 ^b	24,73 13,22	111,57 ^{b,c} 97,01 ^b	34,04 25,69	74,13 ^{a,b} 130,70 ^c	13,75 20,12	84,26 ^{a,b} 61,10 ^{a,b}	32,77 38,77	59,49 ^a 84,43 ^b	18,61 28,61
52	A213001-101	2121,34	A213001 ^{NS}	205	157	217	34,14 53,15	48,52 66,41	54,68 37,47	32,51 72,90	110,62 42,94	48,00 53,84	59,16 56,80	52,99 89,46	99,12 49,09	35,95 32,32	47,51 77,31	24,26 36,29
53	A214003-101	2127,28	A214003 ^{INT}	205	319	206	45,66 ^a 113,30 ^b	29,10 29,59	129,47 ^{b,d} 99,00 ^b	19,88 15,84	ND ^c 118,84 ^b		12,57 ^a 175,39 ^d	14,25 22,93	ND 89,05 ^b		89,72 ^b 163,99 ^d	24,13 44,84
54	A215008-101	2150,47	A215058 ^{INT}	100	129	189	ND ^a ND ^a		70,68 ^b ND ^a	35,58	ND ^a 57,02 ^b		ND ^a ND ^a		17,96 ^b 27,88 ^b	42,98 45,27	ND ^a ND ^a	
55	A216005-101	2150,46	A216005 ^{INT}	315	299	387	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a 86,74 ^b		ND ^a 77,79 ^b	36,02
56	A217004-101	2161,76	A217004 ^{NS}	145	217	362	12,44 17,37	16,57 30,31	46,92 43,54	72,40 114,06	49,58 23,75	82,00 28,22	24,29 34,33	51,43 22,28	54,34 13,25	84,41 32,94	14,83 18,98	14,86 33,52
57	A221002-101	2206,52	A221002	160	328	130	ND ^a ND ^a		ND ^a 243,09 ^b		213,18 ^b ND ^a	17,44	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a	
58	A228001-101	2265,18	A228001 ^{INT}	133	205	217	60,21 ^a 65,10 ^a	19,45 22,24	81,10 ^a 86,95 ^a	10,54 15,60	74,29 ^a 84,20 ^a	19,27 16,18	5,12 ^b 93,16 ^a	32,15 10,84	44,77 ^a 75,50 ^a	8,72 50,39	47,48 ^a 74,95 ^a	27,26 29,17
59	A231002-101	2298,80	A231002 ^{INT}	129	117	133	37,70 ^a 92,95 ^b	20,18 42,29	66,34 ^{a,b} 85,85 ^b	22,16 27,95	93,80 ^b 120,35 ^b	42,13 23,86	58,43 ^a 124,64 ^b	23,19 11,52	63,31 ^{a,b} 70,80 ^{a,b}	45,86 44,36	47,11 ^a 81,96 ^b	34,94 38,18
60	A231004-101	2302,37	A231004	328	117	329	ND ^a ND ^a		ND ^a 279,07 ^b		241,58 ^b ND ^a	21,42	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a	
61	A234005-101	2339,57	A234005 ^{INT}	204	191	117	30,92 ^a 48,59 ^{a,b}	21,56 28,73	79,97 ^b 59,33 ^{a,b}	17,73 18,55	79,38 ^b 67,22 ^{a,b}	22,12 32,49	55,00 ^{a,b} 99,11 ^b	26,00 44,29	49,74 ^{a,b} 48,19 ^{a,b}	39,77 49,60	37,34 ^a 46,07 ^{a,b}	18,90 22,70
63	A237002-101	2362,58	A237002 ^{INT}	191	217	97	ND ^a 103,80 ^b		110,27 ^b 111,48 ^b	27,35 39,89	ND ^a 140,87 ^{b,d}		124,34 ^{b,d} 194,10 ^d	33,42 32,75	16,56 ^c 96,13 ^b	38,64 30,79	62,79 ^b ND ^a	19,31

(continua)

Concentração (µg/g)																		
AC1 BC1																		
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h	
							média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)
64	A241003-101	2386,02	A241003 ^{INT}	91	204	189	43,69 ^a 23,18 ^a	63,84 38,98	26,75 ^a 28,42 ^a	23,51 40,36	60,96 ^{a,c} 44,54 ^a	44,50 33,29	35,13 ^a 93,44 ^c	34,44 30,90	31,98 ^a 20,33 ^a	29,57 33,35	2,19 ^b 27,54 ^a	12,90 44,52
66	A250001-101	2484,98	A250001	205	217	129	29,11 ^a 57,59 ^a	15,92 30,45	60,87 ^{a,b} 61,04 ^{a,b}	19,50 19,00	73,29 ^{a,b} 68,51 ^{a,b}	37,33 35,48	95,64 ^b 94,35 ^b	97,76 31,53	54,82 ^{a,b} 37,64 ^a	42,74 42,27	38,62 ^a 46,81 ^a	14,26 27,45
67	A252002-101	2503,18	A252002	186	214	446	ND ^a ND ^a		146,45 ^b ND ^a	3,24	29,36 ^c ND ^a	52,45 ND ^a	ND ^a ND ^a		ND ^a 63,94 ^c	21,12	ND ^a ND ^a	
69	A255001-101	2542,64	A255001 ^{INT}	204	175	290	14,19 ^{a,b} 28,43 ^a	15,61 29,78	37,33 ^a 36,42 ^a	28,50 22,24	51,65 ^a 40,04 ^a	41,98 41,02	37,40 ^a 67,41 ^a	57,54 50,61	3,16 ^b 22,62 ^a	53,69 42,40	23,57 ^a 19,32 ^{a,b}	31,93 29,95
71	A257009-101	2561,83	A257009 ^{INT}	129	218	131	76,52 ^a 38,03 ^c	23,94 70,65	87,08 ^a 13,73 ^c	23,03 44,85	ND ^b 111,97 ^{a,d}		78,47 ^a 121,88 ^d	23,56 15,78	57,51 ^{a,c} 56,85 ^{a,c}	31,36 64,38	57,83 ^{a,c} 62,66 ^{a,c}	9,47 19,29
72	A273004-101	2715,57	A273004 ^{INT}	204	205	191	9,31 ^a 73,19 ^b	11,66 37,17	29,86 ^{a,b} 73,39 ^b	56,64 27,67	29,11 ^{a,b} 86,35 ^b	80,47 19,90	51,89 ^b 148,67 ^c	76,73 34,03	32,73 ^{a,b} 68,56 ^b	42,73 44,02	32,56 ^{a,b} 71,32 ^b	66,74 20,80
73	A278004-101	2773,72	A278004 ^{INT}	145	165	187	115,86 ^{a,b} 33,67 ^c	23,47 179,22	133,41 ^{b,d} 10,22 ^c	17,68 42,68	16,44 ^c 175,45 ^d	58,12 16,88	107,15 ^{a,b} 185,00 ^d	33,26 9,08	93,83 ^a 84,97 ^a	2,76 75,49	86,79 ^a 93,31 ^a	8,52 20,18
76	A292001-101	2912,67	A292001 ^{INT}	355	345	255	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		12,64 ^b ND ^a	35,30 ND ^a	64,19 ^c 74,94 ^c	35,39 38,91	8,56 ^b ND ^a	37,27
77	A296003-101	2951,33	A296003 ^{INT}	255	257	345	37,33 ^a 40,99 ^a	30,22 42,73	37,50 ^a 59,92 ^a	20,19 24,44	ND ^b 42,90 ^a		44,84 ^a 96,64 ^a	36,82 35,89	51,32 ^a 31,03 ^a	56,61 42,68	45,62 ^a 45,50 ^a	22,79 44,54
80	A310001-101	3089,33	A310001 ^{NS}	255	249	345	22,90 37,56	23,67 52,23	26,76 56,77	14,50 50,33	21,95 31,69	24,06 40,16	45,59 60,38	53,34 44,70	49,71 28,39	72,50 80,89	44,18 25,99	19,39 25,02
83	A316003-101	3151,06	A316003 ^{INT}	249	255	266	33,23 ^a 51,98 ^a	26,51 38,43	42,96 ^a 62,48 ^a	25,27 57,09	47,97 ^a 64,00 ^a	31,87 29,29	96,20 ^a 113,30 ^d	86,79 36,70	18,44 ^{a,b} 23,65 ^{a,b}	68,93 51,50	7,43 ^{b,c} 33,46 ^{a,b}	13,53 18,12
85	A330001-101	3286,10	A330001 ^{INT}	166	307	219	25,94 ^a ND ^b	30,99	ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b		49,47 ^a ND ^b	64,23 ND ^b	33,88 ^a 26,67 ^a	47,33 42,67	43,14 ^a ND ^b	44,89
118	A114002-101	1131,09	A114002 ^{INT}	235	221	206	113,66 ^{a,c} 9,03 ^b	145,09 27,13	82,37 ^{a,c} 177,22 ^c	196,30 59,42	180,09 ^{a,c} 70,57 ^a	70,07 173,61	7,88 ^b 16,10 ^b	51,15 47,42	5,98 ^b 11,12 ^b	33,47 54,82	65,63 ^{a,b} 7,72 ^b	117,11 51,24
120	A194006-101	1929,57	A194006 ^{INT}	156	174	175	47,39 ^a 59,73 ^a	37,48 35,51	96,74 ^{a,b} 79,09 ^{a,b}	21,70 42,60	76,42 ^{a,b} ND ^c	29,06	65,81 ^a 137,75 ^b	45,84 36,69	ND ^c 52,64 ^a		47,36 ^a ND ^c	56,42
121	A361001-101	3601,39	A361001 ^{NS}	291	316	367	35,43 ^a 61,56 ^{a,b,c}	5,16 54,29	56,90 ^{a,b,c} 47,95 ^{b,c}	33,36 36,18	49,80 ^{a,b,c} 63,55 ^{b,c}	26,16 31,81	37,31 ^{a,b,c} 48,97 ^{a,b,c}	44,71 23,42	39,65 ^{a,b,c} 83,43 ^c	16,78 55,58	33,19 ^{a,b,c} 58,63 ^{a,b,c}	7,45 30,02
18	A116014-101	1158,99	A116014 ^{NS}	281	369	282	41,97 40,25	41,42 53,02	43,15 53,93	55,88 53,55	42,94 28,17	64,32 47,57	28,66 50,62	52,96 48,21	24,70 34,69	7,38 58,73	36,47 17,02	58,89 33,91
24	A145008-101	1447,39	A145008 ^{NS}	207	133	235	3,96 3,19	155,00 30,17	21,56 41,45	166,84 67,49	36,28 15,22	77,30 108,28	2,30 35,42	51,45 198,14	1,83 4,07	36,79 51,65	11,52 4,93	121,18 54,87
25	A145015-101	1455,48	A145015 ^{HR}	86	154	174	83,98 ^{AB} 114,58 ^{AB}	45,11 15,68	112,79 ^A 95,93 ^A	18,17 13,12	87,51 ^{AB} 124,90 ^{AB}	26,54 4,54	84,74 ^{AB} 152,10 ^{AB}	31,94 23,73	64,15 ^B 78,49 ^A	36,95 28,88	71,34 ^B 81,09 ^A	24,14 17,11

(conclusão)

Concentração (µg/g)																		
☐ AC1 ■ BC1																		
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			12:00h		16:30h		18:30h		00:30h		05:30h		07:30h	
							média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)	média	CV(%)
29	A155014-101	1554,13	A155405 ^{HR}	115	217	218	107,58 ^{A B}	27,67	119,47 ^{A B}	25,43	121,72 ^B	25,73	96,85 ^{A B}	22,86	77,29 ^A	34,81	78,92 ^A	23,18
							148,41 ^{A B}	28,57	132,91 ^{A B}	16,09	148,13 ^B	25,64	221,32 ^{A B}	23,27	87,78 ^{a,b}	32,36	108,15 ^c	48,63
30	A160001-101	1591,03	A160001 ^{NS}	117	102	130	47,45	21,53	7,74	13,43	59,48	36,77	43,88	32,60	32,33	1,55	42,60	56,90
							71,84	21,97	91,58	30,75	74,97	28,61	123,19	22,11	52,06	50,17	47,73	42,06
33	A170002-101	1691,30	A170002 ^{NS}	129	103	217	38,83	21,73	57,22	24,78	48,93	32,81	59,94	67,37	36,20	36,46	41,56	29,68
							55,87	27,73	72,17	41,30	58,50	27,16	102,23	52,58	35,37	53,15	30,62	16,05
43	A185003-101	1831,73	A185003 ^{HR}	157	129	145	38,26 ^A	6,28	6,85 ^{A B}	39,57	146,56 ^B	38,60	86,42 ^{A B}	28,13	88,74 ^{A B}	28,26	69,99 ^{A B}	5,68
							46,56 ^A	62,96	42,84 ^{A B}	56,92	50,45 ^B	58,61	69,21 ^{A B}	81,76	68,78 ^{A B}	82,40	68,95 ^{A B}	60,22
44	A187005-101	1860,68	A187005 ^{NS}	361	217	204	45,84	18,64	86,79	23,84	76,81	33,15	66,79	2,83	54,45	41,32	5,88	18,74
							99,52	24,90	99,87	12,50	96,22	5,64	113,23	17,77	90,10	56,97	69,51	20,56
45	A196004-101	1946,84	A196004 ^{NS}	189	217	204	19,00	32,54	35,99	26,62	82,89	54,28	35,57	61,34	52,29	51,41	29,37	68,79
							26,86	70,56	22,36	68,66	25,06	27,63	33,92	132,02	32,71	54,84	33,49	41,61
50	A203003-101	2014,18	A203003 ^{NS}	204	319	205	24,36	59,87	36,17	33,61	74,47	3,52	44,52	74,83	47,64	33,29	29,18	78,22
							26,93	48,62	22,40	82,34	27,92	54,76	24,25	97,98	33,75	66,86	34,12	53,60
62	A237001-101	2361,83	A237001 ^{HR}	217	143	169	48,93 ^A	16,17	83,47 ^{A B}	9,45	77,68 ^{A B}	22,89	83,17 ^B	46,97	56,97 ^A	26,96	56,82 ^A	15,32
							73,37 ^A	24,18	78,01 ^{A B}	11,15	80,32 ^{A B}	16,39	104,07 ^B	22,74	65,51 ^A	36,76	67,98 ^A	28,08
65	A246018-101	2467,86	A246018 ^{HR}	103	205	217	ND ^A		ND ^A		ND ^A		61,77 ^B	31,92	ND ^A		ND ^A	
							ND ^A		ND ^A		ND ^A		107,72 ^B	31,92	ND ^A		ND ^A	
68	A254002-101	2530,38	A254002 ^{NS}	204	217	219	7,64	8,40	14,82	12,75	16,44	44,66	17,61	54,28	1,16	49,23	8,82	39,48
							14,32	20,15	14,14	23,84	19,07	47,55	31,41	54,21	11,23	45,90	10,46	25,91
74	A285001-101	2841,09	A285001 ^{NS}	219	345	256	54,99	28,16	82,91	16,29	53,56	24,80	57,77	33,53	45,45	24,19	55,38	26,22
							112,37	16,14	113,12	31,90	129,78	30,46	143,25	16,24	78,56	53,22	71,89	30,86
75	A286001-101	2847,59	A286001 ^{HR}	243	271	217	24,83 ^{A B}	2,77	30,57 ^{A B}	22,19	35,74 ^A	31,78	33,43 ^{A B}	27,66	29,79 ^{A B}	3,89	20,56 ^B	19,54
							31,30 ^{A B}	40,39	28,26 ^{A B}	25,14	66,05 ^A	34,75	55,24 ^{A B}	30,73	30,86 ^{A B}	47,88	29,87 ^B	28,62
78	A300001-101	2987,50	A300001 ^{NS}	129	217	103	41,13	2,88	67,71	11,23	5,64	14,60	5,64	27,82	44,40	24,36	42,96	6,88
							50,15	23,16	50,98	18,51	57,43	14,69	61,63	12,48	52,91	51,48	42,73	36,95
79	A302001-101	3010,98	A302001 ^{NS}	129	129	217	60,84	23,24	102,47	51,94	117,53	54,98	92,60	45,20	70,72	33,78	61,36	32,87
							88,18	52,88	80,61	31,91	107,35	29,56	129,28	52,99	76,49	57,30	93,38	36,41
81	A311002-101	3098,96	A311002 ^{HR}	204	337	361	29,32 ^A	27,22	61,05 ^{A B}	13,32	60,79 ^{A B}	27,66	54,75 ^B	37,95	59,42 ^{A B}	46,66	43,73 ^{A B}	16,38
							55,42 ^A	12,61	81,39 ^{A B}	14,03	81,48 ^{A B}	39,40	113,38 ^B	27,87	52,13 ^{A B}	49,11	53,46 ^{A B}	20,18
84	A318004-101	3171,26	A318004 ^{NS}	81	204	177	59,44	22,00	67,26	25,27	61,30	12,74	7,49	14,19	53,17	42,48	63,34	14,89
							101,64	25,56	80,31	20,76	76,03	24,27	117,38	26,02	77,28	33,21	52,76	8,66
117	A142016-101	1412,62	A142016 ^{NS}	218	231	306	12,86	73,17	134,18	33,32	158,34	2,29	97,14	49,31	76,55	39,63	94,38	53,37
							169,32	21,44	121,98	43,16	160,23	45,68	203,55	48,77	99,75	33,80	108,10	40,30
119	A143002-101	1410,42	A143002 ^{NS}	174	156	175	71,91	54,92	91,25	32,18	69,92	23,22	69,63	46,89	53,61	4,44	58,73	37,62
							94,12	15,94	82,12	15,75	93,23	29,39	108,22	35,73	67,48	39,17	65,97	3,92

Nota: ND compostos não detectados. Letras de minúsculas referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$, com interação (INT) existente entre clones e hora do dia, letras maiúsculas referem-se as diferenças estatísticas observadas $p < 0,05$, sem interação (HR), ou seja, com diferenças existentes apenas entre a luminosidade e não entre clones, NS análise estatística não significativa. As diferenças entre os clones AC1 (em branco) e BC1 (em cinza) são apresentadas entre as linhas da tabela

APÊNDICE C – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE SASONAL DOS CLONES AC1 E BC1

(continua)

							Concentração (µg/g)								
							□ AC1		BC1						
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			outono		inverno		primavera		verão		
							média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	
c21	A141003-101	1388,91	A141003 ^{INT}	131	192	102	64,03 ^a ND ^b	110,30	ND ^b ND ^b			26,89 ^a ND ^b	114,79	ND ^b ND ^b	
c22	A142003-101	1401,04	A142003 ^{INT}	129	234	144	18,29 ^a 46,05 ^{a,b}	135,11 251,66	61,56 ^{a,b} 51,91 ^{a,b}	74,39 99,84		94,31 ^b 49,08 ^{a,b}	58,79 41,41	29,97 ^a 36,20 ^a	58,28 52,78
c23	A143003-101	1420,25	A143003 ^{INT}	174	154	155	76,73 ^a 68,95 ^a	48,70 20,96	48,15 ^b 62,80 ^{a,b}	25,17 48,44		64,52 ^a 54,45 ^b	44,04 25,94	53,79 ^{a,b} 44,31 ^b	28,57 33,69
c26	A145016-101	1454,42	A145016 ^{INT}	104	144	162	75,06 ^a 78,83 ^a	35,14 35,93	49,01 ^b 22,67 ^{b,c}	33,87 52,16		58,62 ^b 25,15 ^{b,c}	23,22 47,46	44,64 ^b 28,85 ^c	34,97 1,19
c27	A147011-101	1464,11	A147011 ^{INT}	103	173	262	64,20 ^a 70,50 ^a	32,51 40,39	37,99 ^b 44,01 ^b	29,76 4,17		51,56 ^{a,b} 42,91	29,45 33,71	44,33 ^{a,b} 28,34 ^c	34,66 12,61
c28	A155003-101	1541,53	A155003 ^{INT}	263	278	264	72,17 ^{a,c} 88,48 ^c	30,03 38,10	67,49 ^{a,c} 67,61 ^a	18,99 31,92		75,59 ^{a,c} 60,01 ^a	18,22 9,45	178,56 ^b 151,64 ^d	24,17 3,62
c30	A160001-101	1591,03	A160001 ^{INT}	117	102	130	54,37 ^a 72,09 ^a	37,43 57,03	38,76 ^b 52,47 ^a	22,27 34,39		40,95 ^b 35,23 ^{b,c}	26,82 23,32	27,55 ^c 44,77 ^b	32,12 23,27
c31	A165004-101	1638,32	A165004 ^{INT}	97	231	246	113,94 ^a ND ^c	29,70	34,25 ^b 76,30 ^d	120,27 1,31		108,43 ^a 76,52 ^d	24,37 13,85	34,63 ^b 58,20 ^b	112,04 37,78
c32	A167004-101	1658,70	A167004 ^{INT}	155	102	171	133,59 ^a ND ^b	107,39	ND ^b ND ^b			ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b	
c33	A170002-101	1691,30	A170002 ^{INT}	129	103	217	51,55 ^a 53,70 ^a	31,85 55,87	41,32 ^a 53,88 ^a	28,63 73,72		50,09 ^a 32,75 ^b	35,95 31,29	93,16 ^a 27,42 ^b	97,79 27,57
c34	A171003-101	1692,47	A171003 ^{INT}	275	156	128	109,51 ^a 82,96 ^a	113,51 82,69	ND ^b ND ^b			ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b	
c35	A172005-101	1702,68	A172005 ^{INT}	173	156	90	184,47 ^a 89,52 ^c	89,89 54,96	38,97 ^{b,c} ND ^d	126,81		53,46 ^b 22,21 ^{b,c}	36,90 47,52	52,01 ^b 17,65 ^c	43,84 48,74
c36	A174001-101	1732,08	A174001 ^{INT}	205	217	189	64,09 ^a 67,49 ^a	31,75 21,04	59,25 ^a 79,11 ^{a,b}	21,72 49,26		82,53 ^b 86,36 ^b	45,13 34,61	171,41 ^c 41,95 ^a	44,04 12,24
c37	A174005-101	1723,17	A174005 ^{INT}	117	392	276	ND ^a 53,03 ^b	162,00	27,58 ^b ND ^a	123,13		ND ^a 26,62 ^b	84,00	131,65 ^c 19,86 ^b	26,45 77,15
c39	A176001-101	1742,97	A176001 ^{INT}	217	292	333	93,72 ^{a,b,c,c} 77,04 ^{a,b,c,c}	78,99 98,61	80,47 ^a 54,42 ^b	33,79 3,83		59,92 ^b 18,78 ^d	25,76 34,38	124,45 ^c ND ^e	38,61
c40	A180002-101	1789,22	A180002 ^{INT}	143	131	189	ND ^a ND ^a		70,33 ^b 38,34 ^b	10,70 61,44		44,83 ^b ND ^a	92,21	77,61 ^b 60,16 ^b	24,62 22,99
c41	A181001-101	1795,75	A181001 ^{INT}	292	333	305	54,00 ^a 65,58 ^{a,c}	30,02 127,39	53,99 ^a 83,26 ^{a,c}	25,88 54,86		62,49 ^a 71,54 ^a	22,83 5,49	ND ^b 105,25 ^c	41,65
c42	A182009-101	1806,00	A182009 ^{INT}	231	293	294	64,89 ^a 70,41 ^a	35,97 54,72	54,74 ^a 63,84 ^a	21,32 33,27		51,42 ^a 33,32 ^b	22,98 18,33	67,80 ^a 34,23 ^b	28,28 14,68
c43	A185003-101	1831,73	A185003 ^{INT}	157	129	145	66,88 ^a 54,45 ^{a,b}	45,83 47,45	26,94 ^{a,b} 22,04 ^{a,b}	62,24 56,77		38,91 ^b 17,37 ^b	47,83 9,53	ND ^c 21,89 ^b	24,71
c45	A196004-101	1946,84	A196004 ^{INT}	189	217	204	32,89 ^a 27,31 ^{a,c}	48,47 43,01	21,88 ^{a,b} 17,97 ^{a,c}	60,10 69,77		36,62 ^a 13,34 ^{c,b}	58,13 22,52	3,44 ^b 17,21 ^c	78,27 19,31
c46	A197001-101	1963,74	A197001 ^{INT}	169	105	82	31,18 ^a 22,55 ^a	37,87 28,21	13,79 ^a 13,69 ^a	84,93 82,64		24,76 ^a 8,81 ^b	73,94 14,84	4,17 ^a 9,08 ^b	126,39 19,16
c47	A197007-101	1962,09	A197007 ^{INT}	394	307	277	87,33 ^a ND ^c	27,90	74,45 ^a 62,16 ^a	14,80 24,50		119,53 ^b 71,80 ^a	36,82 34,44	117,02 ^{a,b} ND ^c	53,58
c48	A199003-101	1980,30	A199003 ^{NS}	129	143	157	81,44 75,92	41,03 86,73	34,53 87,62	122,48 37,38		80,41 31,85	34,65 44,12	20,06 81,19	114,20 4,15
c49	A202004-101	2010,27	A202004 ^{INT}	191	305	318	ND ^a ND ^a		40,42 ^b 86,40 ^{b,c}	119,57 63,39		ND ^a 88,27 ^c	56,00	ND ^a ND ^a	
c50	A203003-101	2014,18	A203003 ^{NS}	204	319	205	32,29 27,61	56,93 53,34	26,16 21,60	47,35 58,26		37,43 18,60	42,85 27,60	8,46 24,33	87,22 21,19
c51	A211001-101	2098,30	A211001 ^{NS}	217	205	173	82,60 84,70	38,16 20,37	77,23 87,39	18,80 39,75		81,67 64,26	31,57 13,48	74,36 53,01	41,02 1,60

(Continua)

Concentração (µg/g)												
□ AC1 BC1												
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)	outono		inverno		primavera		verão	
					média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)
c52	A213001-101	2121,34	A213001 ^{INT}	205 157 217	51,92 ^a 51,82 ^a	30,51 54,91	65,46 ^a 57,38 ^a	37,59 54,54	69,85 ^a 39,74 ^{b,c}	39,90 23,75	13,05 ^{a,b,c} 36,37 ^c	86,38 1,47
c53	A214003-101	2127,28	A214003 ^{INT}	205 319 206	109,50 ^a 119,54 ^a	29,60 43,39	ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b		71,24 ^a ND ^b	28,75 ND ^b
c54	A215008-101	2150,47	A215058 ^{INT}	100 129 189	41,39 ^a ND ^b	107,29	ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b		58,44 ^a ND ^b	42,83 ND ^b
c55	A216005-101	2150,46	A216005 ^{INT}	315 299 387	ND ^a 33,50 ^b	119,00	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a	
c56	A217004-101	2161,76	A217004 ^{INT}	145 217 362	34,30 ^a 31,90 ^a	90,34 104,22	17,02 ^a 16,75 ^{a,b}	35,48 4,77	14,30 ^{a,b} 9,04 ^b	49,37 2,89	48,77 ^a 8,18 ^b	85,87 9,19
c57	A221002-101	2206,52	A221002 ^{INT}	160 328 130	ND ^a 135,06 ^b	348,00	ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a		ND ^a ND ^a	
c59	A231002-101	2298,80	A231002 ^{INT}	129 117 133	56,24 ^a 80,54 ^b	32,40 42,89	58,05 ^a 85,72 ^b	25,85 64,66	98,72 ^b 99,91 ^b	13,21 24,98	47,02 ^a 70,44 ^b	27,83 29,19
c60	A231004-101	2302,37	A231004 ^{NS}	328 117 329	ND 155,06	406,00	ND ND		ND ND		ND ND	
c61	A234005-101	2339,57	A234005 ^{NS}	204 191 117	59,52 52,67	44,13 20,66	73,62 77,73	27,15 39,48	60,11 58,59	31,04 43,58	172,30 29,69	30,55 7,43
c62	A237001-101	2361,83	A237001 ^{INT}	217 143 169	70,54 ^a 73,55 ^a	24,10 19,01	63,85 ^a 84,25 ^a	19,14 37,26	55,72 ^a 60,66 ^a	32,08 49,00	114,51 ^b 28,05 ^c	39,37 7,76
c63	A237002-101	2362,58	A237002 ^{NS}	191 217 97	89,88 ^{a,b} 61,95 ^c	37,25 69,89	95,83 ^{a,b} 108,16 ^b	30,67 33,77	96,79 ^{a,b} 85,52 ^a	23,51 16,68	105,58 ^b 55,20 ^c	16,53 12,30
c64	A241003-101	2386,02	A241003 ^{INT}	91 204 189	23,34 ^a 26,63 ^a	25,93 44,40	61,30 ^b 48,95 ^b	57,27 41,62	120,20 ^c 54,70 ^b	66,81 37,27	47,97 ^b 9,83 ^d	53,70 3,26
c65	A246018-101	2467,86	A246018 ^{INT}	103 205 217	ND ^a ND ^a		33,48 ^b 35,89 ^b	31,14 39,95	ND ^a 36,26 ^b	117,00	147,14 ^c ND ^a	49,21
c66	A250001-101	2484,98	A250001 ^{INT}	205 217 129	50,83 ^a 53,30 ^a	31,11 26,79	54,83 ^a 61,35 ^a	24,04 29,85	48,85 ^{a,c} 47,03 ^a	28,57 4,79	137,82 ^b 33,75 ^c	54,08 8,35
c67	A252002-101	2503,18	A252002 ^{INT}	186 214 446	83,96 ^a ND ^b	108,13	ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b		ND ^b ND ^b	
c68	A254002-101	2530,38	A254002 ^{INT}	204 217 219	11,79 ^{a,d} 12,51 ^{a,d}	35,90 27,95	19,42 ^{a,b} 20,37 ^{a,d}	23,99 26,85	32,41 ^b 43,34 ^b	53,85 11,66	165,02 ^c 11,19 ^d	42,28 9,78
c69	A255001-101	2542,64	A255001 ^{INT}	204 175 290	29,67 ^a 28,55 ^a	37,59 37,04	41,02 ^{a,b} 46,48 ^{a,b}	30,02 43,97	57,13 ^b 65,20 ^b	52,79 66,56	153,08 ^c 26,53 ^a	44,78 13,55
c70	A255011-101	2554,90	A255515 ^{INT}	179 173 331	ND ^a ND ^a		157,72 ^b 166,16 ^b	45,57 48,67	103,91 ^c 81,64 ^c	28,48 29,48	74,93 ^c ND ^a	31,02
c71	A257009-101	2561,83	A257009 ^{INT}	129 218 131	74,36 ^a 36,16 ^b	30,47 35,72	85,61 ^a 93,27 ^a	21,74 32,76	94,79 ^a 87,80 ^a	16,83 18,47	37,34 ^b 23,58 ^b	46,44 15,66
c72	A273004-101	2715,57	A273004 ^{INT}	204 205 191	33,35 ^a 71,16 ^{a,b}	52,70 49,11	24,55 ^a 65,31 ^{a,b}	57,33 113,65	40,26 ^{a,b} 60,61 ^b	47,28 7,86	62,56 ^b 30,57 ^a	66,93 21,34
c73	A278004-101	2773,72	A278004 ^{INT}	145 165 187	113,22 ^a 48,77 ^b	28,32 39,44	56,55 ^b 62,38 ^b	19,49 38,79	73,94 ^b 61,06 ^b	21,08 15,78	3,75 ^c 2,43 ^c	33,37 9,63
c74	A285001-101	2841,09	A285001 ^{INT}	219 345 256	66,02 ^a 94,79 ^b	24,57 51,65	54,31 ^a 73,87 ^{a,b}	25,09 41,15	93,94 ^b 77,15 ^{a,b}	31,62 31,82	44,44 ^a 83,80 ^b	45,09 16,97
c75	A286001-101	2847,59	A286001 ^{INT}	243 271 217	26,41 ^{a,b} 28,98 ^{a,b}	31,72 26,08	32,64 ^{a,b} 35,53 ^b	44,29 52,14	25,84 ^a 21,61 ^a	38,01 28,47	34,27 ^b 13,83 ^c	27,65 5,42
c76	A292001-101	2912,67	A292001 ^{INT}	355 345 255	40,30 ^a ND ^b	117,42	ND ^b 35,14	116,00	ND ^b 32,85 ^{a,c}	127,00	89,00 ^c 47,49 ^{a,c}	27,84 368,75
c78	A300001-101	2987,50	A300001 ^{INT}	129 217 103	54,92 ^a 47,31 ^a	26,28 21,50	60,91 ^{a,b} 58,06 ^a	16,94 29,86	78,66 ^b 57,37 ^a	23,50 12,76	58,96 ^a 32,22 ^c	26,02 13,14
c79	A302001-101	3010,98	A302001 ^{INT}	129 129 217	71,65 ^a 86,29 ^a	46,59 37,44	54,79 ^{a,c} 60,29 ^{a,c}	47,94 55,55	ND ^b 31,21 ^{c,d}		42,44 ^c 24,08 ^d	29,01 11,28
c80	A310001-101	3089,33	A310001 ^{INT}	255 249 345	35,51 ^{a,b,c} 43,38 ^{a,b,c}	31,45 69,26	40,90 ^a 64,40 ^a	48,85 87,36	49,57 ^a 32,49 ^c	43,48 3,15	16,35 ^b 30,62 ^c	46,65 19,64
c81	A311002-101	3098,96	A311002 ^{INT}	204 337 361	53,04 ^a 68,20 ^{a,b}	23,40 33,75	59,61 ^a 96,49 ^c	24,00 56,18	72,41 ^b 91,80 ^c	42,99 47,60	96,41 ^c 54,35 ^a	30,65 19,76
c82	A314001-101	3126,44	A314001 ^{INT}	324 307 256	ND ^a ND ^a		19,18 ^b 31,74 ^b	18,28 82,13	19,28 ^b 45,88 ^{b,c}	94,84 269,16	108,52 ^c 25,96 ^b	79,22 38,45
c83	A316003-101	3151,06	A316003 ^{INT}	249 255 266	57,71 ^a 49,16 ^a	28,95 49,06	59,23 ^a 76,50 ^{a,b}	35,32 79,72	43,50 ^a 51,41 ^a	28,63 67,59	120,64 ^b 32,04 ^c	55,49 12,25
c85	A330001-101	3286,10	A330001 ^{INT}	166 307 219	21,59 ^{a,b} ND ^d	121,32	55,92 ^a 62,57 ^a	43,15 68,11	84,78 ^b 91,00 ^{a,b,c}	41,14 68,53	121,07 ^c 69,20 ^a	45,55 37,54
c118	A114002-101	1131,09	A114002 ^{INT}	235 221 206	82,55 ^{a,b} 102,08 ^{a,b}	157,41 132,65	92,05 ^{a,b} 88,58 ^{a,b}	42,44 65,45	117,41 ^a 65,90 ^b	32,73 29,39	78,20 ^b 55,01 ^b	48,38 35,33
c120	A194006-101	1929,57	A194006 ^{INT}	156 174 175	76,26 ^a 43,96 ^{a,b}	47,45 59,34	39,90 ^b 35,05 ^b	26,82 25,30	53,99 ^b 56,19 ^{a,b}	25,10 68,49	126,56 ^c 36,62 ^b	37,72 13,62
c121	A361001-101	3601,39	A361001 ^{INT}	291 316 367	90,78 ^a 121,06 ^{b,d}	43,11 46,02	104,32 ^{a,b} 113,68 ^{a,b,d}	33,16 36,53	104,70 ^{a,b} 114,11 ^{b,d}	22,59 5,90	ND ^c ND ^c	

(conclusão)

												Concentração (µg/g)			
												□ AC1		BC1	
ID	MPIMP-ID	IR	Nome	Fragmentos (m/z)			outono		inverno		primavera		verão		
							média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	média	CV (%)	
c18	A116014-101	1158,99	A116014 ^{NS}	281	369	282	42,28 37,53	56,24 75,74	59,66 65,78	51,36 26,10	60,40 51,13	34,16 23,11	35,05 48,38	25,71 27,81	
c19	A124002-101	1221,72	A124002	117	103	130	65,59 98,66	62,62 52,27	82,27 111,55	154,98 38,03	71,39 81,72	69,16 57,61	20,56 35,30	30,65 32,87	
c20	A140003-101	1370,74	A140003 ^{EST}	143	233	306	37,71 ^A 29,05 ^A	162,03 228,64	10,59 ^{A,B} 4,91 ^{A,B}	78,38 60,06	16,96 ^{A,B} 5,54 ^{A,B}	102,05 97,41	10,76 ^B 4,15 ^B	78,33 92,29	
c24	A145008-101	1447,39	A145008 ^{NS}	207	133	235	18,23 25,22	171,13 109,63	37,31 35,04	185,32 174,70	46,89 21,87	75,97 122,59	24,48 20,42	119,88 128,28	
c25	A145015-101	1455,48	A145015 ^{EST}	86	154	174	94,99 ^A 89,33 ^A	32,85 16,32	54,42 ^B 61,97 ^B	15,72 29,38	69,32 ^B 55,84 ^B	29,89 21,81	55,07 ^B 44,25 ^B	19,45 26,03	
c29	A155014-101	1554,13	A155405 ^{NS}	115	217	218	103,69 121,90	34,39 31,09	108,98 141,56	34,93 44,99	138,89 126,66	30,78 23,28	128,63 101,60	19,52 24,57	
c38	A175008-101	1740,69	A175008 ^{NS}	392	198	276	54,26 30,37	42,87 113,17	49,15 37,97	10,54 41,21	43,85 35,60	27,95 45,09	28,43 33,96	128,86 30,74	
c44	A187005-101	1860,68	A187005 ^{EST}	361	217	204	70,88 ^{A,B} 86,38 ^{A,B}	38,74 23,46	84,22 ^A 103,42 ^A	22,96 32,91	121,88 ^A 96,58 ^A	34,18 33,84	61,28 ^B 60,99 ^B	20,58 19,37	
c58	A228001-101	2265,18	A228001 ^{EST}	133	205	217	62,82 ^A 79,29 ^A	30,10 23,42	55,49 ^A 74,69 ^A	30,14 24,23	48,33 ^B 40,52 ^B	33,09 36,71	31,36 ^B 37,30 ^B	23,65 13,70	
c77	A296003-101	2951,33	A296003 ^{EST}	255	257	345	41,68 ^A 51,33 ^A	20,89 36,76	46,83 ^{A,B} 41,88 ^{A,B}	73,35 57,57	41,05 ^{A,B} 27,39 ^{A,B}	38,63 22,48	29,13 ^B 26,87 ^B	23,75 20,84	
c84	A318004-101	3171,26	A318004 ^{EST}	81	204	177	63,87 ^A 68,07 ^A	23,09 27,79	89,04 ^B 99,71 ^B	15,85 34,17	90,29 ^B 92,67 ^B	15,91 28,20	129,40 ^B 107,95 ^B	27,72 22,79	
c119	A143002-101	1410,42	A143002 ^{EST}	174	156	175	24,82 ^A 33,28 ^A	36,38 25,05	23,81 ^A 31,12 ^A	24,33 31,36	94,75 ^B 93,71 ^B	96,69 56,76	23,93 ^A 33,88 ^A	33,99 17,72	

Nota: ND compostos não detectados. Letras subscritas referem-se as diferenças estatísticas observadas p<0,05 com interação (INT) existente entre clones e estação do ano, sem interação (EST), ou seja, com diferenças existentes apenas entre a estação do ano e não entre clones, NS análise estatística não significativa. As diferenças entre os clones AC1 (em branco) e BC1 (em cinza) são apresentadas entre as linhas da tabela.

**APÊNDICE D – COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS EM ANÁLISE DO PERFIL
METABÓLICO FRENTE A MUDANÇAS DA FERTIRRIGAÇÃO NA
CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL EM TECIDO FOLIAR E RAÍZES**

TECIDO FOLIAR

(Continua)

										concentração (µg/g)									
										□ IVA 10 ■ IVA 34									
ID	MPIMP-ID	IR	Nitrogênio total (mg/L)			144		206		380		761		1142					
			Nome	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media
42	A101002-101	1010,21	A101002	104	119	84	3,96	53,49	3,28	23,76	13,10	119,00	5,07	173,65	2,84	19,94	2,13	80,87	16,89
43	A105002-101	1052,45	A105002 ^{NT}	190	131	102	9,75	37,58	21,30	121,49	8,30	23,03	7,89	81,93	6,79	22,12	6,97	11,48	18,11
44	A112003-101	1123,18	A112003	130	144	188	15,95	41,61	29,84	74,58	27,02	73,53	21,90	49,98	18,57	32,54	19,71	31,62	29,07
45	A116014-101	1148,59	A116014	281	369	265	21,35	66,26	16,77	50,04	31,99	47,51	47,20	23,67	28,06	39,87	38,24	33,21	21,69
46	A118008-101	1190,02	A118786	86	142	174	51,15	8,05	54,12	21,89	42,54	22,19	55,50	6,78	52,09	13,70	52,41	6,37	55,06
47	A118010-101	1180,85	A118010	132	89	103	3,73	36,08	4,28	33,45	6,49	113,70	18,67	139,70	2,03	28,26	2,08	83,90	9,79
48	A124002-101	1222,12	A124002	117	103	130	32,63	52,25	14,00	17,34	13,87	22,67	20,30	35,41	27,14	10,61	ND	22,12	33,50
49	A140003-101	1368,84	A140003	117	133	306	ND	ND	ND	ND	33,04	37,40	1,19	45,72	1,97	9,96	21,39	119,74	7,93
50	A143003-101	1418,52	A143003 ^C	86	154	174	50,74	11,85	53,24	24,50	43,06	27,99	54,14	9,41	54,95	10,24	58,26	13,53	58,15
51	A144006-101	1428,27	A144006 ^C	86	174	155	49,01	16,61	53,13	16,04	41,38	28,66	54,48	15,38	51,58	10,08	53,98	8,13	58,93
52	A145008-101	1444,03	A145008	350	193	222	3,34	40,99	17,14	179,48	15,88	151,96	4,37	121,73	3,38	19,99	3,50	58,06	12,41
53	A145015-101	1455,29	A145015 ^C	154	174	86	48,44	12,72	53,91	13,95	41,76	21,26	52,02	11,35	50,61	9,77	53,12	11,75	57,26
54	A145016-101	1454,76	A145016 ^{NT}	89	103	173	23,76	26,97	46,35	32,81	31,05	37,75	26,95	21,72	36,81	22,00	25,16	33,59	46,60
55	A147011-101	1464,47	A147011 ^{NT}	103	89	133	22,75	24,41	45,61	35,11	32,92	33,03	27,11	24,35	36,62	19,57	24,08	37,32	46,32
56	A155003-101	1539,92	A155003	263	278	264	49,17	14,03	47,35	12,10	42,28	8,50	51,89	15,02	49,03	13,97	46,89	10,20	52,73
57	A159003-101	1571,54	A159003 ^{INT}	117	205	306	17,94	29,05	22,03	15,43	28,92	35,48	31,18	16,04	28,44	15,81	26,00	23,46	40,67
58	A161007-101	1611,82	A161007 ^{INT}	103	269	284	ND	ND	ND	ND	11,44	27,15	14,17	28,79	18,80	8,55	12,50	62,62	43,03
60	A165004-101	1635,79	A165004 ^C	245	83	231	25,51	46,74	22,77	23,70	25,24	53,50	27,76	14,51	22,37	7,30	19,09	17,71	39,38
61	A171006-101	1690,51	A171006 ^{INT}	117	130	133	ND	ND	29,69	38,92	26,59	52,57	23,48	23,25	ND	44,45	ND	ND	0,06
62	A174001-101	1727,07	A174001	218	217	205	8,93	39,41	14,04	38,72	14,86	126,93	5,36	33,98	13,13	51,88	7,74	88,11	21,39
63	A174005-101	1722,55	A174005	89	163	302	22,41	75,60	29,78	51,53	18,59	74,04	12,32	69,03	20,20	49,49	13,54	81,67	42,25
64	A175008-101	1747,34	A175008 ^{NT}	392	163	90	22,43	66,74	32,65	51,68	23,08	54,45	ND	31,39	9,05	22,05	17,22	42,95	45,71
66	A176001-101	1738,56	A176001 ^C	103	217	292	8,17	64,50	19,01	58,28	17,96	94,45	8,57	19,53	15,00	42,79	13,63	46,84	44,60
67	A187005-101	1857,41	A187005 ^C	205	292	247	27,84	28,70	30,48	37,61	28,71	46,99	41,80	15,95	27,32	6,79	19,40	11,28	32,16
69	A190021-101	1904,22	A190021	104	119	207	23,07	108,70	32,02	31,78	10,59	19,40	11,96	48,28	36,48	13,05	16,43	50,19	30,95
70	A196004-101	1943,40	A196004 ^{NT}	205	217	361	5,83	45,57	7,42	13,90	8,47	52,76	10,98	61,07	13,73	58,72	8,16	44,06	11,87
71	A197007-101	1960,55	A197007 ^C	307	104	97	25,92	50,46	17,86	16,72	18,58	94,31	18,35	14,98	20,78	29,65	5,41	40,28	8,41
72	A199003-101	1974,48	A199003	103	129	205	21,45	58,68	20,02	32,53	29,08	29,72	45,69	37,42	20,10	46,98	16,57	42,82	33,38
73	A202004-101	2006,00	A202004 ^{INT}	191	305	318	17,69	21,77	0,06	0,00	24,23	25,61	25,69	19,35	18,33	11,21	28,08	11,72	41,85
74	A203003-101	2011,21	A203003 ^{NT}	129	89	319	11,76	17,55	11,67	14,21	9,60	18,36	11,52	41,73	23,28	28,40	12,34	16,94	17,58
75	A203018-101	2037,86	A203018 ^{NT}	131	309	119	18,89	33,99	0,06	0,00	32,11	37,03	41,34	38,61	ND	17,53	19,49	34,24	ND
76	A211001-101	2092,41	A211001	89	319	217	9,42	27,05	17,58	50,11	20,88	76,88	17,65	22,24	18,56	18,77	15,03	39,76	17,96
77	A213001-101	2115,06	A213001	319	129	205	5,67	62,06	15,83	57,73	14,28	102,81	13,68	29,03	20,41	61,52	10,27	49,54	22,46

(Conclusão)

concentração (µg/g)																
□ IVA 10 ■ IVA 34																
ID	MPIMP-ID	IR	Nitrogênio total (mg/L)				144		206		380		761		1142	
			Nome	Fragmentos (m/z)			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
78	A214003-101	2121,36	A214003	319	205	217	4,64 9,30	72,60 55,50	13,97 19,90	65,21 83,83	12,79 9,60	106,99 47,30	12,21 8,53	30,88 60,32	18,75 25,44	64,19 82,89
79	A215008-101	2148,68	A215058 ^C	100	204	103	10,15 19,80	28,72 47,37	14,14 23,86	21,57 74,58	17,54 27,89	61,47 83,87	7,71 28,35	17,72 91,67	12,98 39,57	41,99 15,52
80	A217004-101	2165,07	A217004 ^C	155	146	189	3,83 15,84	23,67 39,04	4,52 22,96	4,43 94,74	9,76 20,24	78,13 86,98	2,62 19,65	46,35 73,56	4,04 43,23	34,55 25,69
81	A228001-101	2258,30	A228001 ^C	263	157	146	31,82 17,90	23,43 20,77	32,51 24,13	8,18 26,84	32,24 27,80	4,47 27,36	44,79 30,86	30,08 26,11	34,15 18,89	18,62 37,09
82	A231002-101	2292,96	A231002	290	103	133	33,59 18,89	66,68 8,66	26,90 30,21	24,84 37,79	14,78 21,72	23,82 26,34	18,18 17,59	33,38 12,58	24,54 20,91	40,57 42,24
84	A234002-101	2325,82	A234002 ^{NT}	103	129	217	ND ND		5,66 27,14	30,99 94,63	ND ND		ND ND		ND ND	
85	A236001-101	2346,89	A236001 ^C	103	129	84	20,40 26,98	24,47 54,32	28,57 48,56	35,13 32,59	21,23 29,54	55,46 50,26	13,71 28,65	22,23 42,12	27,19 34,28	41,63 28,95
86	A237001-101	2358,62	A237001 ^C	117	206	143	8,58 19,24	32,39 152,45	16,14 32,49	60,70 72,00	12,46 15,41	134,20 107,14	5,05 8,67	30,87 65,04	8,79 7,79	45,90 26,86
87	A243002-101	2410,97	A243002 ^C	305	217	204	1,24 12,83	40,44 46,91	1,71 18,75	29,72 83,11	5,85 16,30	93,15 107,76	0,46 17,22	67,47 102,18	2,02 39,77	62,97 35,90
88	A245002-101	2440,40	A245002 ^{NT}	205	103	191	17,29 16,02	40,44 139,31	28,38 49,74	40,98 60,37	14,44 16,16	108,45 101,57	7,07 10,25	41,16 72,68	19,96 20,04	58,99 50,79
89	A250001-101	2486,78	A250001 ^{NT}	204	217	117	5,67 14,28	39,57 164,76	7,80 22,65	62,71 84,38	6,76 8,68	135,37 78,65	2,27 4,24	17,26 40,20	3,46 5,28	42,29 12,66
90	A254002-101	2524,24	A254002 ^{NT}	191	204	219	32,94 16,45	38,69 93,68	38,80 34,05	30,82 18,44	16,91 16,53	61,64 50,34	12,68 15,95	50,03 48,99	39,94 33,25	59,01 49,91
91	A255001-101	2534,42	A255001	204	103	191	18,21 21,20	30,19 76,55	29,85 43,37	31,75 21,47	21,28 24,20	61,57 43,84	9,75 21,57	49,87 57,53	26,77 31,89	54,03 54,87
94	A259002-101	2588,65	A259002	117	145	203	21,11 17,53	13,56 15,05	19,54 32,06	24,71 55,51	18,39 21,09	9,01 18,27	19,08 21,94	11,49 15,41	18,27 15,28	17,82 12,78
95	A260006-101	2602,03	A260482 ^{NT}	99	116	283	44,12 43,36	8,20 8,18	53,78 51,57	7,42 20,86	41,75 46,66	6,12 20,28	47,36 46,88	9,20 6,60	38,18 36,26	9,59 7,73
96	A266002-101	2642,20	A266002	116	99	283	26,96 25,02	26,29 31,07	48,53 40,83	32,03 39,31	28,90 39,54	40,14 27,79	22,36 36,44	31,36 46,82	36,14 36,18	26,20 17,43
97	A268003-101	2677,95	A268003	361	217	103	11,84 23,65	11,60 38,03	24,64 30,08	18,53 27,78	38,94 27,72	33,47 42,99	19,82 20,55	6,37 60,07	17,56 29,73	11,70 15,59
98	A273004-101	2705,62	A273004 ^C	259	160	349	18,37 23,05	26,99 62,35	27,35 44,62	24,76 38,63	21,13 26,65	45,39 59,61	14,35 21,07	22,28 48,78	20,51 31,73	37,48 26,74
99	A275004-101	2737,46	A275004 ^C	103	217	205	16,15 26,11	24,24 30,16	20,56 41,61	18,36 61,48	14,88 30,23	42,75 22,49	13,88 28,59	28,46 47,13	19,43 25,41	23,27 24,13
100	A278013-101	2786,53	A278931 ^C	116	99	311	45,78 45,78	6,33 7,53	56,01 55,97	13,24 21,26	46,95 49,97	6,18 12,27	52,28 53,34	7,08 16,17	41,84 37,44	7,21 12,95
101	A285001-101	2836,05	A285001 ^C	219	239	255	7,60 22,78	27,34 30,10	8,34 19,91	25,63 39,16	27,30 30,39	63,25 50,26	11,98 21,46	19,14 59,94	8,59 19,73	22,50 22,93
102	A285012-101	2863,90	A285215 ^{INT}	107	223	123	24,94 ND	25,60	43,84 15,58	54,21 28,20	ND 9,03	17,45 11,05	22,12 11,19	54,26 44,27	15,58 7,46	32,81
103	A288004-101	2857,22	A288004 ^{NT}	374	205	143	5,13 ND	15,55	10,14 26,43	62,84 100,64	ND 10,39	ND 67,69	ND ND		7,70 4,69	7,22 24,27
104	A292001-101	2912,27	A292001	355	345	368	17,56 21,60	25,96 47,46	31,03 38,39	36,48 49,65	29,56 28,95	42,75 19,97	21,25 28,11	14,69 38,07	18,13 22,18	23,83 9,34
105	A294001-101	2902,27	A294001 ^C	345	255	346	18,79 27,81	28,54 62,85	27,57 47,79	40,17 56,23	27,65 32,88	28,54 33,61	20,29 32,01	11,69 28,49	18,80 24,09	26,67 17,72
106	A298001-101	2996,73	A298001 ^C	219	255	191	7,59 23,79	37,10 45,24	7,00 20,53	17,72 69,99	35,71 38,45	54,45 51,62	11,56 33,17	24,11 52,99	6,06 22,05	7,70 31,78
107	A300001-101	2973,75	A300001	103	204	129	18,04 19,76	35,43 21,02	23,92 34,33	18,05 60,96	25,00 27,60	17,24 29,68	29,09 24,10	7,32 49,03	21,98 25,25	10,83 33,24
108	A302001-101	3005,68	A302001 ^{INT}	129	217	103	18,03 33,79	42,15 39,50	16,60 17,11	34,90 45,26	30,30 40,17	36,48 43,48	19,91 31,10	19,17 47,66	10,99 22,72	12,15 26,48
109	A306001-101	3038,10	A306001 ^C	169	354	361	ND ND		ND 22,50	ND 26,43	ND 17,78	ND 39,72	ND 39,59	ND 46,18	ND 15,99	ND 44,62
110	A310001-101	3079,31	A310001	255	345	167	22,89 27,52	25,89 41,71	17,66 17,98	32,51 38,14	33,34 32,02	38,90 38,19	35,98 36,46	15,42 36,27	20,03 20,87	24,10 7,28
111	A310005-101	3060,26	A310005	381	396	397	27,68 31,36	11,51 24,55	37,95 42,74	33,12 27,48	33,14 42,67	45,08 40,08	36,50 39,00	36,17 29,12	24,36 21,35	35,21 41,56
112	A311002-101	3082,44	A311002	103	129	204	27,94 30,52	22,25 51,26	42,25 34,90	19,29 42,20	30,80 32,35	38,00 49,73	27,01 33,15	13,56 18,88	23,41 32,59	12,78 18,66
113	A314001-101	3130,91	A314001 ^{NT}	256	166	191	29,55 22,71	40,29 65,00	45,31 29,96	33,26 39,58	18,24 17,89	50,34 8,49	15,93 20,78	44,76 20,00	28,50 17,72	55,91 42,47
114	A316003-101	3141,81	A316003	249	266	431	39,39 19,06	50,79 42,52	33,98 27,63	28,46 49,71	22,29 27,70	47,59 47,10	18,10 25,03	44,90 30,13	31,60 20,91	55,38 23,55
115	A318004-101	3168,78	A318004	205	133	91	40,98 33,73	17,30 12,60	38,64 41,28	17,89 37,92	37,89 43,57	15,28 20,11	40,21 47,63	12,18 11,83	30,77 29,29	25,09 19,71
116	A322002-101	3182,58	A322002 ^{NT}	91	204	259	32,78 36,39	7,06 17,32	47,94 47,29	33,67 30,93	35,63 34,73	23,20 15,55	33,54 38,61	7,53 7,72	31,81 32,63	10,35 10,41
117	A330001-101	3290,23	A330001	166	280	307	26,08 24,87	20,04 9,59	35,38 25,77	35,11 35,34	24,57 29,06	30,49 29,98	24,69 29,20	24,99 30,70	26,18 23,35	29,34 32,36
118	A340008-101	3375,60	A340008	271	361	362	11,69 12,73	105,25 34,51	8,80 8,23	32,81 40,48	9,66 11,49	13,94 49,64	23,90 9,24	78,37 40,22	6,33 12,58	36,91 36,56

RAÍZES

concentração (µg/g)																
□ IVA 10 ■ IVA 34																
ID	MPIMP-ID	IR	nitrogénio total (mg/L)				144		206		380		761		1142	
			Nome	Fragmentos (m/			media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)	media	CV (%)
41	A278004-101	2772,34	A278004 ^C	339	357	487	68,50 1,75	6,75 32,88	68,03 1,67	10,41 9,28	62,28 ND	3,97	1,68 1,69	18,83 19,58	1,77 1,55	3,84 8,08
42	A101002-101	1010,21	A101002	104	119	84	25,04 23,97	121,71 119,95	1,21 20,79	101,73 121,39	0,36 1,63	54,22 93,05	0,36 9,38	45,61 173,24	30,22 27,67	79,66 99,47
44	A112003-101	1123,18	A112003	130	144	188	35,47 29,52	61,70 77,79	18,71 27,84	27,22 78,09	17,14 30,44	28,92 66,36	9,75 19,01	56,49 78,50	27,93 28,68	87,82 67,20
49	A140003-101	1368,84	A140003	117	133	306	50,92 45,56	21,03 22,39	56,79 39,73	8,76 29,39	56,23 54,04	7,84 28,46	56,50 50,90	6,40 24,82	38,88 35,68	17,00 49,43
51	A144006-101	1428,27	A144006	86	174	155	45,99 45,82	14,30 18,86	54,48 38,88	6,28 30,47	51,50 55,96	5,40 36,22	50,56 48,08	5,73 23,38	34,78 30,91	15,73 54,83
53	A145015-101	1455,29	A145015	154	174	86	48,25 47,41	13,12 14,88	53,53 41,13	9,60 20,61	54,08 52,16	8,09 29,94	50,53 51,43	6,61 15,22	40,10 36,70	10,43 42,91
56	A155003-101	1539,92	A155003 ^{INT}	263	278	264	17,74 37,98	16,07 9,74	14,65 33,50	7,74 9,71	16,46 47,61	17,35 62,99	35,40 35,71	13,19 11,77	35,30 36,68	10,37 14,33
59	A161010-101	1618,91	A161010 ^{INT}	89	208	224	3,56 ND	69,36 ND	1,82 ND	6,01	1,55 ND	9,29	ND ND		ND ND	
65	A178003-101	1760,61	A178003	103	133	217	40,11 26,22	20,66 23,33	27,88 39,38	16,84 51,31	28,56 44,72	27,81 66,40	32,25 21,63	31,79 15,59	30,02 24,44	31,32 12,49
67	A185003-101	1828,67	A185003 ^{NT}	205	292	247	53,05 41,27	32,84 29,31	41,99 34,71	34,16 13,99	45,55 41,45	40,31 66,26	33,25 27,13	25,14 8,85	23,78 21,68	18,88 16,22
68	A187005-101	1856,12	A187005	89	129	157	30,63 29,45	40,89 31,56	15,63 22,40	19,13 19,71	21,51 27,20	24,19 63,79	23,12 17,07	11,26 34,50	15,87 25,42	54,96 21,33
73	A202004-101	2006,00	A202004 ^{NT}	191	305	318	51,90 39,55	22,72 26,67	31,99 42,77	19,10 27,52	38,78 74,16	20,22 67,28	42,24 27,65	37,13 34,44	19,69 30,06	4,76 21,00
74	A203003-101	2011,21	A203003	129	89	319	28,08 22,88	36,34 25,51	0,05 24,96	0,00 20,55	24,67 52,57	20,03 68,45	25,56 21,48	10,92 22,32	33,87 ND	38,21
76	A211001-101	2092,41	A211001	89	319	217	14,63 11,36	17,81 23,46	9,47 9,45	19,29 22,38	9,97 20,78	33,32 93,10	12,81 18,53	41,51 119,16	7,35 8,77	10,69 20,88
77	A213001-101	2115,06	A213001 ^{INT}	319	129	205	16,31 2,36	178,55 35,76	1,31 0,98	41,44 40,18	2,76 1,20	72,47 68,67	3,75 2,38	86,96 54,84	ND 1,39	38,27
80	A217004-101	2165,07	A217004 ^{INT}	155	146	189	ND 29,22	ND 12,09	ND 20,07	ND 90,10	26,10 52,93	48,15 67,96	26,35 11,60	82,24 42,11	30,46 37,10	29,65 49,41
81	A228001-101	2258,30	A228001 ^C	263	157	146	22,06 34,28	49,76 21,24	9,06 27,73	15,84 35,45	16,93 32,52	31,78 41,57	14,70 20,21	27,56 36,00	17,15 32,17	19,97 4,78
83	A230002-101	2285,86	A230002 ^{NT}	103	154	204	42,20 33,90	15,76 12,65	ND 36,45	15,18	39,72 57,01	26,27 66,82	32,52 39,41	15,42 25,42	ND ND	
86	A237001-101	2358,62	A237001 ^{INT}	117	206	143	50,42 34,05	36,52 41,56	27,51 29,50	30,12 28,61	31,04 23,56	41,89 32,44	27,99 27,69	21,50 36,69	14,51 25,35	12,82 16,35
90	A254002-101	2524,24	A254002	191	204	219	33,27 29,39	54,57 34,93	24,89 32,81	43,54 31,53	39,80 20,46	30,78 19,72	42,68 27,90	39,89 28,05	21,81 34,18	31,39 24,69
92	A257009-101	2554,56	A257009 ^{INT}	129	131	91	71,48 14,52	16,71 51,01	63,70 16,42	5,91 10,94	60,47 12,58	10,02 11,07	9,38 17,32	44,24 34,56	14,85 11,30	45,28 41,56
93	A275014-101	2735,11	A275014 ^{INT}	129	83	203	68,90 12,05	20,42 11,87	58,45 8,97	7,29 22,63	59,65 9,69	12,88 23,95	8,39 11,32	10,47 38,13	8,97 8,94	19,68 20,10
110	A310001-101	3079,31	A310001 ^{INT}	255	345	167	ND 39,29	ND 36,52	ND 22,02	ND 33,89	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	
115	A318004-101	3168,78	A318004 ^{INT}	205	133	91	35,01 56,85	18,47 20,31	33,63 42,66	17,79 27,10	31,58 54,22	17,88 48,16	45,52 42,57	12,65 16,70	52,29 44,68	9,54 5,84

Análise estatística INT- variável com interação, diferenças entre clone e dosagem de nitrogênio, NT – metabólito com diferença apenas entre as doses de nitrogênio; C – metabólito com diferença entre os clones, mas não entre as doses de nitrogênio. Os compostos sem marcação em subscrito não apresentaram diferenças significativas (p> 0,05).